

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

Говорова Юлия Александровна

**АНТИГЛИКИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА
ПРОИЗВОДНЫХ ПИРАЗОЛО[5,1-С]-1,2,4-ТРИАЗИНА И ИХ ВЛИЯНИЕ НА
ОТДАЛЕННЫЕ НАРУШЕНИЯ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ ГЛАЗА ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ**

3.3.6. - Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
Спасов Александр Алексеевич
академик РАН, Заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор

Научный консультант:
Наumenко Людмила Владимировна
доктор медицинских наук, профессор

Волгоград, 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПОЗДНИХ ГЛАЗНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ САХАРНОГО ДИАБЕТА, РОЛЬ НЕФЕРМЕНТАТИВНОГО ГЛИКИРОВАНИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ	15
1.1. Эпидемиология и клинические особенности глазных осложнений сахарного диабета.....	15
1.2. Основные патобиохимические механизмы развития глазных поздних осложнений сахарного диабета	17
1.2.1. Полиоловый путь превращения глюкозы.....	17
1.2.2. Окислительный стресс	19
1.2.3. Протеинкиназа С	24
1.2.4. Воспаление	25
1.2.5. Апоптоз	27
1.2.6. Неоангиогенез	28
1.3. Влияние неферментативного гликирования на катарактогенез, развитие диабетической ретинопатии и офтальмогипертензии при длительной гипергликемии.....	31
1.3.1. Реакции неферментативного гликирования белков	31
1.3.2. Диабетическая ретинопатия.....	35
1.3.3. Диабетическая катаракта.....	38
1.3.4. Офтальмогипертензия при сахарном диабете	42
1.4. Основные принципы современной фармакотерапии глазных осложнений сахарного диабета	45
1.5. Перспективы применения антигликирующих соединений для фармакологической коррекции отдаленных последствий сахарного диабета, связанных с органом зрения.....	49
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	54
2.1. Регулирующие документы	54
2.2. Реактивы и вещества.....	54
2.3. Оборудование и программное обеспечение.....	55

2.4. Экспериментальные животные.....	56
2.5. Исследование антигликирующей активности соединений	57
2.6. Исследование острой токсичности.....	58
2.7. Исследование нейротоксикологического профиля в комплексе тестов по S. Irwin	58
2.8. Методы изучения специфического фармакологического действия	59
2.8.1. Моделирование сахарного диабета 1 типа	59
2.8.2. Определение влияния соединения АВ-19 на содержание гликированного гемоглобина	65
2.8.3. Измерение внутриглазного давления.....	67
2.8.4. Биомикроскопическое исследование хрусталика.....	68
2.8.5. Измерение уровня глазной микроциркуляции с помощью лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ)	68
2.8.6. Исследование биоэлектрической активности сетчатки с помощью электроретинографии	69
2.8.7. Патоморфологическое исследование хрусталиков	71
2.8.8. Морфометрическая оценка линейной клеточной плотности ганглиозного слоя сетчатки крыс.....	72
2.8.9. Определение содержания конечных продуктов гликирования и карбоксиметиллизина в хрусталиках.....	73
2.8.10. Исследование деформируемости эритроцитов.....	73
2.8.11. Исследование местнораздражающего действия.....	79
2.9. Методы статистической обработки.....	81
ГЛАВА 3. НАПРАВЛЕННЫЙ ПОИСК АНТИГЛИКИРУЮЩИХ СОЕДИНЕНИЙ	82
3.1. Влияние производных азоло[5,1-С]-1,2,4-триазина на неферментативное гликирование белков.....	83
3.2. Зависимость антигликирующей активности соединений от их химической структуры	87
3.3. Заключение	88
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ГЛАЗ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ И ИХ КОРРЕКЦИЯ СОЕДИНЕНИЕМ АВ-19 И АМИНОГУАНИДИНОМ	89

4.1. Влияние соединения АВ-19 на содержание гликированного гемоглобина в крови у крыс при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете	90
4.2. Влияние соединения АВ-19 и амингуанидина на структурные и функциональные изменения глаз при экспериментальном стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете	92
4.2.1. Влияние соединения АВ-19 и амингуанидина на прозрачность хрусталиков животных с сахарным диабетом	92
4.2.2. Влияние соединения АВ-19 и амингуанидина на патоморфологическую картину хрусталиков.....	94
4.2.3. Влияние соединения АВ-19 и амингуанидина на внутриглазное давление	96
4.2.4. Влияние соединения АВ-19 и амингуанидина на уровень конечных продуктов гликирования и карбоксиметиллизина в хрусталиках	97
4.2.5. Влияние соединения АВ-19 и амингуанидина на глазную микроциркуляцию.....	99
4.2.6. Влияние соединения АВ-19 и амингуанидина на электрофизиологические параметры сетчатки	100
4.2.7. Влияние соединения АВ-19 и амингуанидина на плотность ганглиозного слоя сетчатки	101
4.3. Заключение	103
ГЛАВА 5. ГЕМОРЕОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЯ АВ-19 И АМИНОГУАНИДИНА.....	104
5.1. Влияние соединения АВ-19 и амингуанидина на деформируемость эритроцитов	106
5.1.1. Действие соединения АВ-19 и амингуанидина на деформируемость эритроцитов крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом	106
5.1.2. Влияние соединения АВ-19 и амингуанидина на деформируемость эритроцитов, обработанных глиоксалем	107
5.2. Заключение	109
ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕСТНОРАЗДРАЖАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ АВ-19 ПРИ ОДНОКРАТНОМ НАНЕСЕНИИ НА КОНЪЮНКТИВУ ГЛАЗА МОРСКИХ СВИНОК.....	111
6.1. Результаты исследования местнораздражающего действия соединения АВ-19 при однократном нанесении на конъюнктиву глаза морских свинок	111
6.2. Заключение	112

ГЛАВА 7. НЕЙРОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ АВ-19, ВЫЯВЛЕННЫЕ В МНОГОТЕСТОВОМ НАБЛЮДЕНИИ ПО S. IRWIN	113
7.1. Нейротоксический профиль соединения АВ-19 при введении различных доз изучаемого вещества в многотестовом наблюдении по S. Irwin	113
7.2. Заключение	115
ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	117
ВЫВОДЫ	129
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	131
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	132
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	133

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В России по данным на 2017 г. зарегистрировано 256,1 тыс. человек с сахарным диабетом 1 типа и 4,15 млн. с сахарным диабетом 2 типа (Дедов И. И. [и др.], 2018), а в 2020 г. было зарегистрировано уже 265,4 тыс. и 4,43 млн. соответственно (Дедов И. И. [и др.], 2021). Осложнения сахарного диабета являются в России основными причинами смерти в популяции больных сахарным диабетом 1 и 2 типов, в первую очередь, из-за высокого сердечно-сосудистого риска (Петров В. И. [и др.], 2013; Стаценко М. Е., Деревянченко М. В., 2019). Глазные заболевания, которые относятся к поздним осложнениям сахарного диабета (катаракта, ретинопатия, глаукома), хоть и не являются летальными, однако приводят к прогрессирующему снижению зрения вплоть до слепоты, а, следовательно, к ухудшению качества жизни пациентов с диабетом (Липатов Д. В. [и др.], 2014; Нероев В. В. [и др.], 2016; Нероев В. В., Зайцева О. В., Михайлова Л. А., 2018).

Одним из основных патогенетических путей развития поздних осложнений сахарного диабета является неферментативное гликирование (или реакция Майяра), интенсивность которого нарастает при хронической гипергликемии; гликирование приводит к избыточному образованию его конечных продуктов (КПГ) (Спасов А. А., Соловьева О. А., Кузнецова В. А., 2017). Выделяются следующие пути патогенетического действия на клетки и ткани КПГ: активация рецептор-опосредованных сигнальных путей (в основном, через специфические рецепторы – рКПГ), вызывающие окислительный стресс, воспаление, апоптоз, пролиферацию и модуляцию экспрессии генов; изменение структуры и функции долгоживущих белков, например, за счет необратимого кросслинкинга с КПГ; прямое гликирование внутриклеточных белков, приводящее к нарушению функций клеток (Леонова Т. С. [и др.], 2019).

Таким образом, неферментативное гликирование и процессы, непосредственно связанные с ним, вызывают нарушения структуры и функции

органа зрения при сахарном диабете (Yamagishi S., 2011). Активация оси КПП/рКПП вызывает генерацию активных кислородных метаболитов (АКМ) (окислительный стресс), образование молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1) (лейкостаз, тромбообразование), провоспалительных цитокинов, хемокинов и проапоптических белков (ИЛ-6, ИЛ-1 β , ФНО- α , Вах, iNOS), апоптоз нейронов сетчатки, клеток Мюллера, клеток ретинального пигментного эпителия, перицитов и эндотелиальных клеток сетчатки, эпителиальных клеток хрусталика, эндотелиального фактора роста (VEGF) (неоангиогенез), активацию протеинкиназы C (уменьшение белков плотных контактов эндотелиальных клеток сетчатки ZO-1, ZO-2 – патологическая проницаемость гематоофтальмического барьера, а уменьшение коннексонов в хрусталике - катарактогенез) (Yamagishi S., 2011; Lu M. [et al.], 1998; Yamagishi S., 1997; Warboys C. M., Hong-Boon Toh H.-B., Fraser P. A., 2009; Romeo G. [et al.], 2002; Kim J. [et al.], 2016; Kim J. H. [et al.], 2010; Fan L., Yan H., 2016; Jousseaume A. M. [et al.], 2004; Capitão M., Soares R., 2016; Kaji Y. [et al.], 2007; Yamagishi S., Matsui T., Nakamura K. [et al.], 2008). Гликирование мембран эритроцитов и гемоглобина приводит к снижению их деформируемости, а, следовательно, к нарушению гемоперфузии сетчатки и тканевой гипоксии (Емельянов В. В., 2016; Iwata H. [et al.], 2004; Brown C. D. [et al.] 1993; Brown C. D. [et al.], 2001). Гликирование коллагена базальной мембраны сосудов сетчатки приводит к увеличению ее толщины и снижению эластичности (McNulty M., Mahmud A., Feely J., 2007; Zhang W.-J. [et al.], 2017; Hosoda Y. [et al.], 1992). Гликирование кристаллинов, накопление КПП в хрусталиках приводят к снижению их прозрачности (Fan X., Monnier V. M., 2021; Pokupec R. [et al.], 2003; Liang J. J., Fu L., 2001; Yan H., Willis A. C., Harding J. J., 2003; Satish Kumar M. [et al.], 2004; Su S. [et al.], 2014; Kumar M. S. [et al.], 2004; Reddy V. S., Reddy G. B., 2016; Bahmani F. [et al.], 2016; Karumanchi D. K. [et al.], 2015). Неясен механизм влияния неферментативного гликирования на уровень ВГД, однако такая связь, вероятно, существует (Tezel G. [et al.], 2007; Sandra M. F. [et al.], 2004; Endo M. [et al.], 2001).

Селективное ингибирование реакции неферментативного гликирования представляется перспективной стратегией профилактики и лечения поздних

осложнений сахарного диабета. Используемые в клинической практике ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, блокаторы рецепторов ангиотензина II (сартаны), антиоксиданты (липоевая кислота), статины проявляют несущественную антигликирующую активность и не применяются для фармакологической коррекции глазных осложнений сахарного диабета (Prasad K. [et al.], 2017; Спасов А. А. [и др.], 2013). Современные подходы к лечению диабетических ретинопатии, катаракты и глаукомы, признанные эффективными, остаются в то же время радикальными, имеют ряд серьезных ограничений и осложнений; их успешность часто является временной, учитывая хронический характер сахарного диабета (McNulty R. [et al.], 2004; Falavarjani K. G. [et al.], 2013; С. Ю. Копачев [et al.], 2017; Hanna Ramy M. [et al.], 2019; Rezzola S. [et al.], 2021).

Таким образом, одной из актуальных проблем офтальмофармакологического направления является поиск новых соединений, обладающих антигликирующим действием, которые являются перспективными для профилактики (возможно, купирования последствий неконтролируемого гликирования) и лечений глазных осложнений сахарного диабета.

Степень разработанности

Взаимодействие по типу конкурентного ингибирования с молекулярными мишенями гликирования за связывание с моносахаридами, продуктами Амадори и дикарбонильными соединений — это и есть антигликирующее действие (Емельянов В. В., 2016). Оно основано на способности антигликирующих соединений образовывать ковалентные связи с карбонильными группами моносахаридов, промежуточных и конечных продуктов гликирования.

Экспериментально исследованное антигликирующее соединение — аминогуанидин — в настоящее время используется только как препарат сравнения при изучении новых ингибиторов реакции Майяра из-за вызываемых им побочных эффектов. В первом рандомизированном клиническом исследовании аминогуанидина (пимагедина) была выявлена его способность тормозить прогрессирование диабетической ретинопатии у пациентов с сахарным диабетом

1 типа (Thornalley P. J., 2003; Bolton W. K. [et al.], 2004). Опубликованы данные об ингибирующем влиянии аминогуанидина на катарактогенез и развитие ретинопатии у лабораторных животных с экспериментальным сахарным диабетом (Swamy-Mruthinti S. [et al.], 1996; Hong Yan [et al.], 2008; Luo D. [et al.], 2012; Kern T. S. [et al.], 2001; Mishra A. [et al.], 2012).

За последние 5 лет были опубликованы экспериментальные данные об эффективности соединений растительного происхождения против прогрессирования диабетической ретинопатии (Li R.-L.[et al.], 2020; Bautista-Pérez R. [et al.], 2021; Kim Y. S. [et al.], 2020; Qian S. [et al.], 2019; Hwang S. H. [et al.], 2019; Jinjuan Lv. [et al.], 2020). Также есть данные об эффективности флавоноидов, апокаротиноидов, карнозина, L-лизина, цинка и др. против диабетического катарактогенеза (Patil K. K. [et al.], 2019; Kianpour M. [et al.], 2019; Matsuda S. [et al.], 2017; Barman S. [et al.], 2019; Bahmani F. [et al.], 2019).

В клинической практике применяются производные азолазинов - ингибиторы дипептидилпептидазы-4 (Спасов А. А. [и др.], 2013). Относящиеся к азолазинам производные азола[5,1-с]-1,2,4-триазина обладают широким спектром активности: они обладают антидиабетическим, противовирусным, антибактериальным, антиоксидантным, диуретическим и противоопухолевым действием (Русинов В. Л., 2008; Rusinov V. L. [et al.], 2017; Saad H. A. [et al.], 2011; Al-Adiwish W. M. [et al.], 2013). Таким образом, является перспективным поиск среди них новых соединений, обладающих антигликирующей активностью.

Цель исследования

Целью настоящего исследования является поиск соединений, обладающих антигликирующей активностью среди производных азола[5,1-с]-1,2,4-триазина и изучение влияния соединения–лидера на отдаленные нарушения структуры и функции глаза при экспериментальном сахарном диабете.

Задачи исследования:

1. Проведение поиска новых антигликирующих соединений среди производных азоло[5,1-с]-1,2,4-триазина.
2. Анализ зависимости между структурой и антигликирующей активностью производных азоло[5,1-с]-1,2,4-триазина.
3. Исследование влияния наиболее активного антигликирующего соединения на изменение прозрачности хрусталика глаза при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете у крыс.
4. Оценка влияния наиболее активного антигликирующего соединения на уровень внутриглазного давления при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете у крыс.
5. Изучение влияния наиболее активного антигликирующего соединения на уровень микроциркуляции и электрофизиологические показатели сетчатки глаза при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете.
6. Исследование патоморфологических изменений хрусталика и сетчатки глаза при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете и определения содержания в хрусталике конечных продуктов гликирования и карбоксиметиллизина.
7. Изучение влияния наиболее активного антигликирующего соединения на реологические свойства крови лабораторных животных.
8. Изучение местнораздражающего действия наиболее активного соединения.
9. Изучение нейротоксикологического профиля соединения-лидера по антигликирующей активности.

Научная новизна

Впервые проведено исследование антигликирующей активности производных азоло[5,1-с]-1,2,4-триазина (пиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазины и триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины). Наиболее активными из исследованных соединений оказались производные пиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазина. При этом

установлено, что наличие этоксикарбонильной группы в C^3 гарантирует проявление антигликирующей активности как для производных пиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазина, так и для производных триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазина.

В ходе работы получены данные о способности соединения АВ-19 препятствовать возникновению патологических изменений структуры и функции глаз при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете. Впервые установлено влияние соединения АВ-19 на офтальмотонус. Показано, что соединение АВ-19 способно влиять на гемореологические свойства крови. Определено отсутствие местнораздражающего действия для данного соединения и его низкое токсическое действие в отношении поведения животных.

Теоретическая и практическая значимость работы

В результате выполненного исследования были получены данные, подтверждающие целесообразность поиска антигликирующих соединений среди производных азоло[5,1-с]-1,2,4-триазина. Получены результаты о специфическом фармакологическом действии нового соединения - натриевой соли диэтилового эфира 4-оксо-1,4-дигидропиразололо[5,1с]-1,2,4-триазин-3,8-дикарбоновой кислоты, моногидрат. Установлена способность данного соединения препятствовать развитию нарушений структуры и функции глаз при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете.

Методология и методы исследования

Исходя из поставленных задач исследования, проведенного на базе ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и Научного центра инновационных лекарственных средств ВолгГМУ, были определены методология и методы исследования.

Экспериментальные исследования были проведены с использованием достаточного количества лабораторных животных (нелинейных половозрелых мышей, крыс, кроликов породы Шиншилла и морских свинок) и в соответствии с

требованиями действующего «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Миронов А.Н., 2012), со статьей 11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (Собрание законодательства Российской Федерации, 2010, № 16, ст. 1815; № 31, ст. 4161), в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии № 81 от 03.11.2016 г. «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств», согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Использовались валидированные методы тестирования активности соединений *in vivo* и *in vitro*, рекомендованные для проведения доклинических исследований методы для статистической обработки и анализа полученных данных (Сергиенко В. И. [и др.], 2012). Проведенные исследования были одобрены Локальным Этическим Комитетом ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России протокол № 2093-2019 от 18.01.2019 г.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Новый ряд химических производных пиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазина является перспективной группой соединений для поиска веществ, ингибирующих образование конечных продуктов гликирования;
2. Соединение АВ-19 (натриевая соль диэтилового эфира 4-оксо-1,4-дигидропиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-3,8-дикарбоновой кислоты) оказывает высокую антигликирующую активность, превышающую вещество сравнения аминогуанидин, *in vitro* и *in vivo*;
3. Соединение АВ-19 тормозит развитие катарактогенеза, ретинопатии и офтальмогипертензии, ассоциированных с сахарным диабетом.

Внедрение результатов исследования

Экспериментальные данные по способности новых соединений ингибировать образование конечных продуктов гликирования, а также анализ влияния различных заместителей на уровень антигликирующей активности в ряду новых производных пиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазина используется при синтезе новых соединений в ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина». Новый комплексный подход к изучению антигликирующей активности веществ применяется в работе Научного центра инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством ВолгГМУ. Результаты работы внедрены в лекционный курс на кафедре фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности результатов работы подтверждается достаточным объемом экспериментального материала с использованием современных методов и методических подходов, отвечающих поставленным задачам. Сформулированные в диссертации выводы были подтверждены экспериментальными данными, анализом литературного материала, точностью статистической обработки полученных результатов.

Основные положения диссертационной работы излагались на V съезде фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств» (Ярославль, 2018); на XXIII региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области «Актуальные проблемы экспериментальной медицины» (Волгоград, 2018); на Всероссийской научной конференции молодых ученых, посвященной 95-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина «Достижения современной фармакологической науки» (Рязань, 2018); на 77-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2019); на XLVI Международной научно-практической конференции «Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования» (Москва, 2021); на

XV Международной научно-практической конференции молодых ученых (Курск, 2021); на Республиканской научно-практической конференции «Новые технологии в офтальмологии 2021» (Казань, 2021).

По теме диссертационного исследования было опубликовано 12 печатных работ, из них 4 в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени; был получен 1 патент на изобретение.

Личный вклад автора

Автору принадлежит определяющая роль в проведении данного исследования. Вклад автора работы заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования по изучению фармакологической активности и токсикологических свойств соединения АВ-19. При написании диссертационной работы автором был выполнен анализ отечественной, зарубежной литературы, сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение результатов, формулировка выводов и практических рекомендаций, написание и оформление рукописи диссертационного исследования.

Структура и объем работы

Рукопись изложена на 186 страницах машинописного текста. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 5 глав собственных результатов исследований, обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, который включает в себя 432 источников: 366 иностранных и 66 отечественных. Диссертация иллюстрирована 7 рисунками, 15 таблицами.

ГЛАВА 1. АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПОЗДНИХ ГЛАЗНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ САХАРНОГО ДИАБЕТА, РОЛЬ НЕФЕРМЕНТАТИВНОГО ГЛИКИРОВАНИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ

1.1. Эпидемиология и клинические особенности глазных осложнений сахарного диабета

При анализе литературных данных были выявлены следующие особенности распространения глазных поздних осложнений сахарного диабета.

У пациентов с сахарным диабетом в 2–5 раз выше вероятность развития катаракты, чем у лиц без данного заболевания [195]. Общая распространенность диабетической катаракты среди взрослых пациентов в России составляет 30,6 %, причем при сахарном диабете 1 типа этот показатель выше, чем при сахарном диабете 2 типа (32,6 % и 29,2 % соответственно), а частота встречаемости катаракты увеличивается при увеличении продолжительности заболевания [298].

Распространенность ранней диабетической катаракты в популяции детей и подростков, по данным разных исследований, колеблется от 0,7 до 3,4 % [120], при этом ежегодно регистрируется около 80000 новых случаев заболевания сахарным диабетом 1 типа только в США [219]. Отношение рисков (hazard ratio) развития катаракты у пациентов с диабетом составляет 5,81 (95 % CI: 4,60-7,33), причем отношение рисков развития диабетической катаракты выше у женщин (6,29, 95 % CI: 4,63-8,55), чем у мужчин (5,20, 95 % CI: 3,64-4,75). Возникновение диабетической катаракты у большинства педиатрических пациентов является первым признаком сахарного диабета 1 типа или возникает в течение 6 месяцев после постановки диагноза.

Согласно данным систематического обзора вероятность развития катаракты у пациентов с сахарным диабетом 2 типа зависит от возраста и контроля гликемии, а продолжительность диабета, пол, артериальное давление не являются влияющими факторами [144]. По отечественным данным, в возрастной группе больных с сахарным диабетом старше 40 лет заболеваемость катарактой составляет

80 %. При длительности сахарного диабета 2 типа более 10 лет катаракту диагностировали у 29 % больных, более 30 лет – у 89 %. Данный тип катаракты встречается в среднем у 70 % пациентов с сахарным диабетом [61]. С другой стороны, наличие катаракты увеличивает вероятность развития у пациентов диабетической ретинопатии (ДР). Так, в исследовании Seong II Kim, Sung Jin Kim было показано, что ДР появилась у 37,41 % тех пациентов, которые не имели катаракты, и у 75,53 % пациентов, которые имели данное заболевание [228].

Распространенность диабетической ретинопатии (ДР) среди больных сахарным диабетом составляет около 35 % во всем мире [180]. ДР обычно диагностируется в течение 5-7 лет после начала сахарного диабета 1 типа примерно у 20 % больных, через 10 лет частота ДР у больных сахарным диабетом 1 типа увеличивается до 60 % и до 100 % через 30 лет [159]. Около 50-70 % больных сахарным диабетом 2 типа имеют ДР через 10 лет от начала диабета, 90 % пациентов после 30 лет от начала диабета [298]. Распространенность ДР среди взрослых в России (18 лет и старше) с сахарным диабетом 1 типа составляет 35,25 %, а при сахарном диабете 2 типа – 16,67 % [54]. Это означает, что почти каждый пятый пациент (17,63 %) с диабетом имеет те или иные проблемы со зрением. Анализ распространенности ДР с учетом пола показал, что существенной разницы между мужчинами и женщинами нет [66]. Исследования распространенности ДР в различных возрастных группах показали, что при сахарном диабете 1 типа пик выявления ДР приходится на возрастную группу 50-59 лет, а при сахарном диабете 2 типа – на более старшую группу 60–69 лет [36].

Общепризнанно в научных кругах, что сахарный диабет в данное время является одним из самых дискуссионных факторов риска развития глаукомы [39]. Проведенный Vovonas и др. мета-анализ показал значимую ассоциацию сахарного диабета и первичной открытоугольной глаукомы (при отношении шансов (odds ratio) = 1,50, 95 %-доверительный интервал – 1,16, 1,93) [117]. По этим данным, у пациентов с диабетом на 27–50 % увеличивается риск развития глаукомы. Итоги ретроспективного исследования продолжительностью 10 лет (Корея) показали, что отношение рисков (hazard ratio) возникновения первичной открытоугольной

глаукомы у пациентов с сахарным диабетом составило 1,19, по сравнению с пациентами без данного заболевания [204]. В то же время одним из выводов более раннего Роттердамского проспективного исследования заболеваемости первичной открытоугольной глаукомой со средним сроком наблюдения за пациентами 6,5 лет является то, что сахарный диабет не является фактором риска развития глаукомы [217].

Хотя повышенное внутриглазное давление (ВГД) само по себе не тождественно клиническому диагнозу «глаукома», у пациентов с диабетом общее среднее повышение уровня ВГД составляло 0,09 мм рт. ст. на каждые 10 мг/дл повышения глюкозы натощак по данным метаанализа 47 исследований из 16 стран мира [138].

1.2. Основные патобиохимические механизмы развития глазных поздних осложнений сахарного диабета

1.2.1. Полиоловый путь превращения глюкозы

Общеизвестно, что около 5-10 % нефосфорилированной глюкозы превращается в сорбитол альдозоредуктазой (АР), эпителиальным ферментом, который использует восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН) в качестве кофактора [7, 34, 80-81, 243]. Роль АР в диабетическом катарактогенезе экспериментально подтверждается тем, что хрусталики крыс, имеющие низкую экспрессию этого фермента или не имеющие ее вовсе, при инкубировании в среде с высоким содержанием глюкозы устойчивы к развитию диабетической катаракты [79].

При повышении концентрации глюкозы в хрусталике и насыщения цикла Кребса полиоловый путь становится более интенсивным, поскольку избыток глюкозы стимулирует АР [410]. Вскоре после полной активации АР более 30 % глюкозы подвергается полиоловому пути превращения [222]. Перепроизводство сорбитола – гидрофильного многоатомного спирта – у пациентов с сахарным диабетом происходит быстрее, чем он может быть превращен во фруктозу с

помощью фермента сорбитолдегидрогеназы (СДГ). Диффузия сорбитола через клеточную мембрану невозможна из-за его полярного характера. Гиперосмотический эффект создается, когда накопление сорбита приводит к повышенному поступлению жидкости в хрусталик, в результате чего хрусталиковые волокна разжижаются, дегенерируют, образуют помутнения и очаги светорассеяния [121]. Для уменьшения рассеивания света межклеточное пространство в хрусталике должно быть меньше длины световой волны. В условиях осмотического стресса межклеточное пространство расширяется, что ведет к снижению оптических свойств хрусталика [28].

Параллельно с осмотическим стрессом хрусталика интенсивный полиоловый путь превращения глюкозы истощает запасы НАДФН, который конкурентно используется глутатионредуктазой, что ведет к снижению концентрации восстановленного глутатиона (GSH) и меняет соотношение НАДФН/НАД⁺, которые являются необходимыми коферментами для окислительно-восстановительных реакций [80, 421]. Глутатион является одним из основных эндогенных антиоксидантов и имеет среди них самую высокую концентрацию в хрусталике, особенно в ЭКХ, что делает хрусталик резервуаром глутатиона для внутриглазной жидкости [273]. Следовательно, как ключевой фермент в полиоловом пути обмена глюкозы, АР способствует образованию активных кислородных метаболитов (АКМ) из-за истощения запасов таких антиоксидантных молекул, как НАДФН и глутатион, поэтому ингибирование альдозоредуктазы подавляет выработку АКМ в глазах [113].

Фруктоза, продуцируемая при участии сорбитолдегидрогеназы, фосфорилируется до фруктозо-3-фосфата, который был идентифицирован в хрусталиках диабетических крыс [366] и способен превращаться в 3-дезоксиглюкозон [254]. Данные соединения описываются в литературе как активные гликирующие агенты, принимающие участие в образовании конечных продуктов гликирования (КПГ) [397], которые в свою очередь активизируют НАДФ-оксидазу, побочным продуктом реакции окисления которой является супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot -}$) [369]. К тому же в результате ферментативной

активности сорбитолдегидрогеназы накапливается избыток внутриклеточного НАДН, являющегося субстратом для НАДН-оксидазы.

Таким образом, одним из эффектов интенсифицированного при гипергликемии полиолового пути превращения глюкозы является накопление активных кислородных метаболитов (АКМ) и КППГ.

Несмотря на присутствие альдозоредуктазы (АР) в ганглиозных клетках сетчатки, клетках Мюллера, эндотелиальных клетках, перицитах и астроцитах [220, 356], полиоловый путь, вероятно, не является основным механизмом, вызывающим диабетическую ретинопатию (ДР), поскольку концентрация сорбитола в сетчатках диабетических крыс ниже критического уровня, при котором возникает внутриклеточный осмотический стресс [243].

1.2.2. Окислительный стресс

Сетчатка является высокоспециализированной тканью, особенно чувствительной к окислительному стрессу из-за высокого потребления кислорода [143]. В условиях гипергликемии активируются метаболические пути, которые приводят к увеличению образования активных кислородных метаболитов (АКМ) и других свободных радикалов, являющихся активными акцепторами электронов [3]. В результате неферментативного гликирования образуются его конечные продукты (КППГ), которые могут вызывать окислительный стресс путём различных химических и клеточных механизмов, в том числе за счёт активирования НАДФ-оксидазы (КППГ и их специфические рецепторы – рКППГ – могут непосредственно индуцировать генерацию активных кислородных метаболитов через активацию НАДФН-оксидазы [69]) и гликирования антиоксидантных ферментов, например, глутатион-S-трансферазы [131], каталазы [119], супероксиддисмутаза (СОД) [276], что снижает уровень антиоксидантной защиты и является индикатором окислительного стресса [183]. При гипергликемии активность антиоксидантных ферментов может снизиться из-за измененного метаболизма их кофакторов, в частности, ионов металлов [84].

Таким образом, активация НАДФ-оксидазы в эндотелиальных, гладкомышечных, глиальных, ретинальных клетках – это один из основных источников активных кислородных метаболитов [212, 258, 420]. НАДФ-оксидаза способна активироваться под влиянием КПГ, протеинкиназы С, ангиотензина II [91].

При гипергликемии клетки Мюллера [302], эндотелиальные клетки сетчатки [194], фоторецепторы [390] и клетки пигментного эпителия сетчатки [89, 346] производят большее количество активных кислородных метаболитов (АКМ), чем в норме. Уровни ферментных и неферментных антиоксидантов были снижены у пациентов с сахарным диабетом и у животных с экспериментальным диабетом [139, 281]. *In vitro* высокий уровень глюкозы в среде, в которой содержалась культура клеток перицитов сетчатки крыс, приводил к апоптозу перицитов, сопровождавшемуся как уменьшением соотношения Bcl-2 (антиапоптотический белок) к BAX (апоптотический белок), так и уменьшением содержания супероксиддисмутазы (Mn-SOD) и каталазы [415]. Перициты демонстрируют большую чувствительность к окислительному стрессу, чем эндотелиальные клетки сетчатки [389], которые отвечают на избыток АКМ эндотелиальной дисфункцией [156] за счет снижения вазодилатирующей активности оксида азота (NO) и его ингибирующей роли в отношении экспрессии молекул адгезии (ICAM и VCAM), что связано с повышенным преобразованием NO в пероксинитрит (ONOO⁻) [255]. Снижается свойство NO влиять на агрегацию, прилипание и инфильтрацию сосудистой стенки нейтрофилами, моноцитами (трансмиграция), на агрегацию, адгезию тромбоцитов [177, 315]. ONOO⁻ нарушает работу клетки путем неконтролируемого нитрирования белков. Нитрирование вызывает депрессию калиевых каналов, ответственных за вазорелаксацию. ONOO⁻ способен приводить к повреждению ДНК, что является стимулом для активации ядерного фермента PARP [174]. Данная полимераза истощает внутриклеточную концентрацию НАД⁺, замедляет гликолиз, транспорт электронов и образование АТФ, блокирует активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, что провоцирует развитие эндотелиальной дисфункции.

При окислительном стрессе повышается экспрессия всех изоформ NOS в сетчатке, что приводит к избытку NO и его метаболитов [206]. Глазной кровоток регулируется NO, получаемым из эндотелия и эфферентных нитергических нейронов. Дисфункция эндотелия ухудшает глазную гемодинамику за счет снижения биодоступности NO и увеличения выработки АКМ. С другой стороны, избыток NO (ассоциирован с диабетической ретинопатией (ДР) [416]), образованный iNOS, экспрессируемой под влиянием медиаторов воспаления, вызывает нейродегенерацию, апоптоз клеток сетчатки (в частности, эндотелиальных [286] и клеток пигментного эпителия [311]) и глиоз [297, 391], хотя по другим данным вызванный гипергликемией апоптоз ганглиозных клеток сетчатки ассоциировался со снижением концентрации NO [172]. NO опосредует повышенную VEGF-индуцированную сосудистую проницаемость при ДР [419].

Апоптозу при окислительном стрессе подвергаются клетки пигментного эпителия сетчатки [278] и фоторецепторы [390], а клетки Мюллера, астроциты и микроглия проявляют признаки глиоза (гиперплазии) [380]. При развитии ДР наблюдается гибель ганглиозных клеток сетчатки, сопровождающийся по данным электронной микроскопии типичными для апоптоза морфологическими особенностями (окраска хроматина и зубчатые ядра клеток) [137]. При исследовании на мышах db/db (линия для экспериментального моделирования сахарного диабета 2 типа) были выявлены снижение толщины сетчатки по результатам оптической когерентной томографии (ОКТ) (дегенерация), повышенная сосудистая флюоресценция (прорыв гематоофтальмического барьера (ГОб)) и сниженный электрофизиологический ответ (нейроденерация) наряду с признаками апоптоза клеток Мюллера (дефрагментация ДНК, экстернализация фосфатидилсерина, потеря мембранного потенциала митохондрий и активация каспазы-3), повышением концентрации митохондриальных свободных радикалов, белковых карбонилов, эндотелиального фактора роста (VEGF), цитокинов (монокитарный хемоаттактический протеин-1 (MCP-1), ФНО- α , ИЛ-6) и фактора клеточной адгезии ICAM-1 в сетчатке [271], что согласуется с провоспалительной,

проапоптической, проагиогенной и нейродегенеративной направленностью изменений в сетчатке при сахарном диабете [146].

Активные кислородные метаболиты (АКМ) вызывают перекисное окисление липидов (ПОЛ), конечными продуктами которых являются реактивные карбонильные соединения (альдегиды, кетоны, основания Шиффа и др.) [7, 380]. Митохондрии и цитоплазматические мембраны содержат относительно большое количество полиненасыщенных жирных кислот в своих фосфолипидах, что делает их мишенью для липопероксидации, дестабилизации мембран и деструкции клеток [357]. Как разновидность нервной ткани, сетчатка имеет высокую концентрацию полиненасыщенных жирных кислот и кислорода [250]. При диабетической ретинопатии (ДР) в сетчатке обнаруживаются повышенные уровни маркеров ПОЛ (малонового диальдегида (МДА), глиоксаля, 4-гидрокси-2-ноненаля и др.), по сравнению с интактной сетчаткой, что говорит об интенсификации в ней ПОЛ [161, 380]. Повышенное гликирование белков при сахарном диабете приводит к увеличению количества АКМ, которые вызывают ПОЛ [427].

Тот факт, что именно метаболически активные эпителиальные клетки хрусталика (ЭКХ) служат источниками АКМ, подтверждается данными исследования, полученными с помощью проточной цитометрии, культуры ЭКХ, культивированных в среде с повышенным содержанием (40 мМ) глюкозы в течение 48 ч [379]. Из ЭКХ активные кислородные радикалы диффундируют в другие структуры хрусталика [38].

Дисбаланс между активными кислородными метаболитами (АКМ) и антиоксидантами может приводит к перекисному окислению (ПОЛ) в хрусталике [148], одним из вторичных продуктов которого является малоновый диальдегид (МДА). МДА – это высокореактивное соединение, которое способно реагировать с ϵ -NH₂-группами белков, формируя новые связи внутри и между молекулами с образованием Шиффовых оснований. Содержание МДА в хрусталиках при сахарном диабете в исследованиях используется как показатель окислительного стресса [379].

При повышенном уровне глюкозы в хрусталике образуются карбонильные интермедиаты как итоговые продукты аутоокисления глюкозы и как промежуточные продукты неферментативного гликирования белков хрусталика. К ним относятся 3-дезоксиглюказон, глиоксаль, метилглиоксаль (МГ). Данное явление в литературе описывается как карбонильный стресс – состояние, которое сопровождается увеличением содержания карбонильных продуктов свободнорадикального окисления в организме. К карбонильным продуктам метаболизма относятся альдегиды, кетоны, карбоновые кислоты, углеводы и др. Карбонильные соединения способны взаимодействовать с аминокруппами хрусталиковых белков, вызывая их структурные модификации, поперечные сшивки с формированием белковых агрегатов с высокой молекулярной массой (ВММ) [227], в частности, активным гликирующим агентом кристаллинов является МГ [227]. Образование карбонильных групп белков происходит различными биохимическими путями и является частью так называемой окислительной модификации белков, пусковыми факторами которой чаще всего служат АКМ. Возрастание содержания карбонильных групп белков в хрусталике связано с катарактогенезом [76], в том числе с диабетическим [93]. Таким образом, и окислительный, и карбонильный стрессы вносят вклад в диабетический катарактогенез.

Окислительный стресс может вызывать повреждение клеток [178] и апоптоз клеток трабекулярной сети [88], снижение их способности к фагоцитозу, самоочищению трабекулы [294] и ремоделированию внеклеточного матрикса [396] за счет изменения экспрессии генов, связанных с ним [333]. В культуре клеток трабекулярной сети, обработанных перекисью водорода, *in vitro* наблюдались снижение жизнеспособности клеток [280], ингибирование пролиферации клеток [301], изменение структуры цитоскелета клетки (актина и виментина) [280, 430], увеличение синтеза компонентов внеклеточного матрикса (фибронектина, ингибитора активатора плазминогена 1, фактора роста соединительной ткани) [301], повышение экспрессии медиаторов воспаления (интерлейкинов: ИЛ-1 α , ИЛ-6, ИЛ-8; молекулы адгезии эндотелиальных лейкоцитов-1 (ELAM-1)) [361]. Данные

изменения в клетках трабекулярной сети, наиболее вероятно, связаны с повышенной экспрессией NF κ B, который активирует нисходящие сигнальные пути активируемые митоген-активируемой протеинкиназой (MAPK) [277].

1.2.3. Протеинкиназа C

Протеинкиназа C (ПКС) активирует ферменты, такие как НАДФ-оксидаза и липооксигеназы, продуцирующие активные кислородные метаболиты [188] и поддерживающие окислительный стресс в эндотелиальных клетках [307]. ПКС была обнаружена в клетках Мюллера [309] и клетках пигментного эпителия сетчатки [289]. ПКС стимулирует увеличение продукции эндотелиального фактора роста (VEGF) и трансформирующего фактора роста- β (TGF- β), обуславливающих повышение ангиогенной активности эндотелиоцитов, что приводит к структурному ремоделированию микроциркуляторного русла [51]. Ингибирование атипичной ПКС в эксперименте на трансгенных мышах снижало повышенную проницаемость сосудов сетчатки [207].

Ингибирование ПКС уменьшало индуцированную VEGF и конечными продуктами гликирования (КПГ) потерю белков ZO – плотного контакта эндотелиальных клеток [359]. ПКС вызывает повышенную адгезию к эндотелиальным клеткам как лейкоцитов (лейкостаз) [284, 305], так и моноцитов [124], что приводит к окклюзии ретинальных сосудов при сахарном диабете и является начальным этапом патогенеза ДР.

Активированная ПКС вносит свой вклад в развитие диабетического катарактогенеза. Так, у крыс с очень высоким уровнем глюкозы крови при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете через 2 недели после введения стрептозотоцина в хрусталиках были обнаружены повышенные уровни ПКС, фосфолипазы C, ДАГ и начальные признаки кортикальной катаракты [308]. В определенной степени это объясняется фосфорилированием коннексина-43 активированной ПКС, снижением межклеточной связи через щелевые контакты

(коннексоны) в эпителии хрусталика, каждый из которых образован шестью субъединицами коннексина [238].

Существуют данные о роли ПКС в регуляции оттока внутриглазной жидкости по основному пути [418]. На уровень оттока влияют, как активаторы, так и ингибиторы ПКС, вероятно, за счет регулирования ПКС фосфорилирования легких цепей миозина трабекулярной сети [328] и повышения экспрессии матричной металлопротеиназы (ММП) ТС [82].

Таким образом, ингибирование ПКС в эксперименте приводило к изолированной релаксации ТС [376], что должно стимулировать отток внутриглазной жидкости [386].

1.2.4. Воспаление

Диабетическая ретинопатия (ДР) развивается на фоне системной воспалительной реакции при сахарном диабете, о чем свидетельствует повышение концентрации цитокинов и хемокинов как в сыворотке крови, так и в стекловидном теле и внутриглазной жидкости [332], что связано как с прорывом гематоофтальмического барьера (ГОБ), так и с продукцией воспалительных и проангиогенных факторов непосредственно в глазу (макрофаги, микроглия, клетки Мюллера) [408, 428]. Такие молекулы адгезии, как ICAM-1 и VCAM-1, рассматриваются как возможные кандидаты на роль основных маркёров, отражающих наличие процесса активации лейкоцитов и эндотелиальных клеток [30]. У крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом наблюдается повышенная активация молекул межклеточной и сосудистой адгезии (ICAM-1 и VCAM-1) [59]. ICAM-1 и VCAM-1 способствуют адгезии, трансмиграции лейкоцитов в эндотелий, потенцируют лейкостаз при ДР [218]. Лейкостаз взаимосвязан с повышенной экспрессией ICAM-1 [300, 211] и наблюдается в течение нескольких дней от начала развития заболевания у крыс со стрептозотицин-индуцированным диабетом [234]. Увеличение содержания лейкоцитов в ретинальных сосудах начинается через 1 неделю после индукции

экспериментального диабета [67]. Адгезия лейкоцитов к эндотелиальным клеткам считается одним из первых гистологических изменений, наблюдаемых при ДР [30]. Вероятно, лейкостаз является одной из причин апоптоза эндотелиальных клеток [234].

Рецепторы конечных продуктов гликирования (рКПГ) действуют как эндотелиальные адгезионные рецепторы для лейкоцитарных интегринов и усиливают миграцию лейкоцитов [317, 331]. Взаимодействие КПГ-рКПГ провоцирует активацию Ras-митоген-индуцируемой протеинкиназы C и транслокацию ядерного фактора NF-κB в клеточное ядро. Последнее событие запускает транскрипцию различных генов-мишеней, включая VEGF, ICAM-1, VCAM-1 [424], активирует клетки, несущие на своей поверхности белковые комплексы S100/calgranulin и HMGB1, которые взаимодействуют с Toll-like рецепторами и потенцируют воспалительные процессы [317]. Ингибирование рКПГ и/или КПГ ингибирует экспрессию ICAM, развитие лейкостаза у животных в условиях экспериментального сахарного диабета [112, 292].

Связывание КПГ с рКПГ на поверхности моноцитов индуцирует продукцию инсулиноподобного фактора роста и цитокинов (например, интерлейкина 1 (ИЛ-1), фактора некроза опухоли (ФНО-α)). Это приводит к усилению воспалительных реакций и процессов хемотаксиса [1]. При гипергликемии активизируются рКПГ и их лиганды на клетках Мюллера [193], которые продуцируют повышенные уровни провоспалительных молекул, таких как ИЛ-1β, ФНО-α, ИЛ-8 [74], ИЛ-6, NO и циклооксигеназа-2 (ЦОГ-2) [193]. Аматори-гликированный альбумин (КПГ) стимулирует микроглию к выработке ФНО-α на ранних стадиях диабетической ретинопатии (ДР) [327]. При сахарном диабете микроглия сетчатки приобретает реактивный фенотип, что приводит к распространению провоспалительных сигналов и воспалительному повреждению [368]. Длительная активация микроглии связана с высокими уровнями глутамата, iNOS и провоспалительных цитокинов (ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-12 и ФНО-α), которые могут привести к активации каспаз, усугубляя гибель нейронов сетчатки [382]. Фоторецепторы сами продуцируют воспалительные цитокины, такие как ICAM-1, ЦОГ-2 и iNOS при

экспериментальном диабете [290]. Они дополнительно высвобождают растворимые факторы *in vitro*, которые стимулируют выработку ФНО- α в лейкоцитах и эндотелиальных клетках [291].

У пациентов с диабетической катарактой уровень гликированного гемоглобина положительно коррелировал с содержанием инсулиноподобного фактора роста 1, основного фактора роста фибробластов (bFGF) и ИЛ-6 во внутриглазной жидкости [431].

1.2.5. Апоптоз

Избыток глюкозы, активных кислородных метаболитов (АКМ) и сорбитола в хрусталике индуцируют апоптоз эпителиальных клеток хрусталика (ЭКХ) при диабетическом катарактогенезе [97, 379]. К настоящему времени известно, что белки семейства Bcl-2 относятся либо к индукторам апоптоза (Bad, Bax, Bid, Bak), либо к ингибиторам (Bcl-2, Bcl-X) [13, 35]. При объединении ингибитора апоптоза белка Bcl-2 с белком активатором апоптоза Bax итог (торможение или активация апоптоза) будет определяться тем, какой белок будет преобладать в этом объединении [5, 35, 49]. Гипергликемия приводит к увеличению содержания Bax относительно Bcl-2 и активирует апоптоз [83]. У диабетических крыс были обнаружены повышенное накопление КПП, активация NF- κ B, экспрессия Bax и активация каспазы-3 в эпителиальных клетках помутневших хрусталиков [68].

Содержание культуры клеток перицитов [393], клеток Мюллера [189] и эндотелиальных клеток сетчатки [187] в среде с высоким содержанием глюкозы приводит к фрагментации митохондрий и повышенной гетерогенности их мембранного потенциала, а, следовательно, и к апоптозу [337]. Такие активные гликирующие агенты, как глиоксаль (ГЛ) и метилглиоксаль (МГ), не только приводят к повышению образования конечных продуктов гликирования (КПП) и активных кислородных метаболитов (АКМ) в клетках сетчатки, но и к деполяризации мембран митохондрий, снижению внутриклеточного pH, повышению экспрессии мРНК эндотелиального фактора роста, а именно VEGF-A,

и увеличению числа апоптических клеток [350, 354, 370]. У крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом отмечается уменьшение толщины наружного ядерного слоя сетчатки, повышение экспрессии Вах и снижение экспрессии Bcl-2, наряду с увеличением количества апоптических клеток [353]. У таких животных зафиксирована сниженная экспрессия окклюдина (трансмембранного белка, обеспечивающего плотные контакты между эндотелиальными клетками), повышенная проницаемость для флюоресцеина сосудов сетчатки и внутриклеточное накопление КППГ [107]. КППГ приводит к потере перicyтов при диабетической ретинопатии (ДР) [111]. Наряду с накоплением КППГ, у диабетических животных отмечается повышенная экспрессия pKPPG, NF-kB, каспазы-3 и апоптоз ганглиозных клеток сетчатки как у лабораторных животных [196, 236], так и у людей с сахарным диабетом [244], вероятно за счет запуска механизма аутофагии. Уже на ранних стадиях ДР отмечаются морфологические изменения в слое ганглиозных клеток сетчатки и изменения их мембранного потенциала [275].

Таким образом, гипергликемия обуславливает свой цитотоксический эффект и апоптоз глиальных, эндотелиальных клеток сетчатки и ЭКХ за счет накопления в них конечных продуктов гликирования, высокореактивных свободных радикалов и митохондриальной дисфункции [200, 310].

1.2.6. Неоангиогенез

Среди ангиогенных факторов в настоящее время наиболее важным считается эндотелиальный фактор роста (vascular endothelial growth factor, VEGF) [105, 106, 323]. VEGF играет одну из основных ролей в патогенезе диабетической ретинопатии (ДР), индуцируя гиперпроницаемость сосудов сетчатки, повреждая гемафтальмический барьер (ГОБ) и стимулируя рост новообразованных сосудов [328]. VEGF – единственный сосудистый фактор роста, чей уровень увеличивается в культуре ретинальных клеток в условиях гипоксии [345]. Значительное

увеличение уровня VEGF в стекловидном теле регистрируется у пациентов с ДР, особенно с пролиферативной формой [400].

VEGF-A (гомомерный гликопротеин, состоящий из двух субъединиц с молекулярной массой по 23 кДа [395]) является основным активатором неоваскуляризации в условиях ишемии и экспрессируется в здоровой сетчатке [133]. В сетчатке VEGF-A продуцируют клетки ретинального пигментного эпителия [100, 364], перициты [364], эндотелиоциты [360], клетки Мюллера [405], ганглиозные [328], глиальные клетки [265] и фоторецепторы [241], но, предположительно, наибольшее значение для стимуляции неоангиогенеза имеет производство VEGF эндотелиоцитами [414] и клетками Мюллера [413]. У крыс с условным нокаутом (выключением) гена VEGF в клетках Мюллера при экспериментальном моделировании сахарного диабета морфологические показатели (лейкостаз, утечка флюоресцеина из сосудов сетчатки, количества бесклеточных сосудов) и биохимические показатели (содержание альбумина в сетчатке и стекловидном теле, уровни ФНО- α , ICAM-1, NF κ B в сетчатке) были менее выражены, что показывает, что VEGF, продуцируемый клетками Мюллера, в первую очередь отвечает за повреждение ГОБ и неоваскуляризацию сетчатки [263, 264].

Интравитреальное введение рекомбинантного VEGF-A вызывало разнообразные сосудистые изменения, включавшие окклюзию капилляров, гиперплазию эндотелия сосудов, повышение проницаемости ретинальных сосудов, появление отека сетчатки, кровоизлияний, четкообразных вен, микроаневризм, неоваскуляризации сетчатки и радужки с развитием неоваскулярной глаукомы и тракционной отслойки сетчатки у экспериментальных животных [86, 155, 215]. Повышение содержания VEGF-A во внутриглазной жидкости и стекловидном теле обнаруживались у пациентов с различными стадиями ДР [179, 411]. Максимальная концентрация VEGF-A отмечалась у пациентов с вторичной неоваскулярной глаукомой [201].

Гипоксия является наиболее важным триггером для повышения активности VEGF в основном через синтез гипоксия-индуцибельного транскрипционного

фактора-1 (HIF-1 α) [168]. При гипоксии снижается активность пролил-гидроксилаз, которые являются сенсорами молекул кислорода, что препятствует убиквитинизации и деградации HIF1 α и HIF2 α , которые запускают экспрессию HIF-опосредованных генов, включая ген VEGF [343]. Накопление HIF-1 α в клетках Мюллера индуцирует экспрессию VEGF, которая способствует увеличению экспрессии и активности матричной металлопротеиназы 2 (ММП-2) в соседних эндотелиальных клетках [407]. ММП-2, в свою очередь, вызывают апоптоз эндотелиальных клеток сетчатки, повреждая их митохондрии, и осуществляют протеолиз компонентов внеклеточного матрикса, способствуя ангиогенезу [229].

Изменения уровня глюкозы являются еще одним важным фактором, участвующим в экспрессии VEGF. Как длительно существующая высокая концентрация глюкозы, так и резкий подъем уровня глюкозы в среде могут повышать экспрессию VEGF в культуре клеток ретинального пигментного эпителия [402]. КПП стимулируют продукцию VEGF [72, 333]. Так, интравитреальная инъекция КПП (гликированные продукты бычьего сывороточного альбумина) у крыс и кроликов увеличивала уровни мРНК VEGF в ганглиозных, биполярных клетках сетчатки, а также в клетках ретинального пигментного эпителия [73]. Кроме того, активация HIF-1 α посредством КПП через внеклеточный киназный путь может участвовать в экспрессии VEGF [325]. Усилить экспрессию мРНК VEGF могут различные факторы роста – инсулин, IGF-I, фактор роста фибробластов (FGF) и фактор роста тромбоцитов (PDGF), а также провоспалительные цитокины (ИЛ-1, ИЛ-6), некоторые гормоны и онкогены [168].

VEGF-индуцированное фосфорилирование протеинкиназы C (ПКС) и дальнейшее убиквитирование белков плотных контактов окклюдина Ser490 на мембранах эндотелиоцитов приводит к уменьшению содержания окклюдина в сетчатке, вызывая разрыв плотных соединений и способствуя повышению проницаемости сосудов [266, 306]. VEGF-индуцированное фосфорилирование адгезивного белка кадгерина приводит к его эндоцитозу и разрушению межклеточных соединений, что способствует дисфункции гематоофтальмического барьера (ГОБ) [175]. Существуют данные, что NO, продуцируемый

эндотелиальной синтазой оксида азота (eNOS), играет значительную роль в VEGF-индуцированной сосудистой проницаемости и ангиогенезе [269, 296].

VEGF индуцирует экспрессию сериновых протеаз, активаторов тканевого плазминогена и матричных металлопротеиназ (ММП) и подавляет тканевые ингибиторы ММП 1 и 2 типа [401, 403], что способствует в протеолизу базальной мембраны сосудов. Другим механизмом, посредством которого VEGF может способствовать ангиогенезу, является активация молекул адгезии ICAM-1 [264] и VCAM-1 [145]. Есть данные прямой корреляции между VCAM-1 и VEGF в стекловидном теле пациентов с сахарным диабетом и диабетической ретинопатии (ДР) [412].

Согласно современным представлениям, повышение VEGF во внутриглазной жидкости может служить причиной офтальмогипертензии в случае формирования, последующей тракции и синехиального закрытия угла передней камеры глаза фиброваскулярной мембраной [268]. Этот процесс является вторичным по отношению к неоангиогенезу при пролиферативной ДР [267], однако способностью производить VEGF обладают и клетки беспигментного цилиарного эпителия [123]. Адгезия и сократительная способность фиброваскулярной мембраны обусловлены наличием клеток, богатых актином и фибронектином, внеклеточной тканью, особенно в периваскулярных областях [268]. Фиброзно-сосудистая мембрана богата коллагеном I и III типов [224]. Есть данные о том, что крысы со стрептозотоцин-индуцированным диабетом уровень сывороточного VEGF может служить предиктором диабетического катарактогенеза [128].

1.3. Влияние неферментативного гликирования на катарактогенез, развитие диабетической ретинопатии и офтальмогипертензии при длительной гипергликемии

1.3.1. Реакции неферментативного гликирования белков

Гликирование представляет спонтанную неферментативную реакцию белков с сахарами (реакция Майяра), обусловленную взаимодействием между

восстанавливающими сахарами или дикарбонильными продуктами их распада и аминокислотными остатками лизина, аргинина и серосодержащих аминокислотных остатков с образованием между ними ковалентной связи [9]. На гликирование можно взглянуть как на составную часть общего процесса – карбонильного стресса – состояния, которое сопровождается увеличением содержания карбонильных продуктов свободнорадикального окисления в организме [11]. Наиболее широкое распространение среди них в организме имеют альдегиды, которые могут образовываться в том числе в процессе аутоокисления глюкозы или превращения оснований Шиффа при модификации лизина в составе белков глюкозой [11, 26].

На первой стадии неферментативного гликирования по типу нуклеофильного присоединения происходит реакция конденсации карбонильной группы альдегида восстанавливающего сахара с боковой свободной аминогруппой, ϵ -аминогруппой лизина или гуанидиниевой группировкой аргинина [4]. В результате быстро образуются лабильные основания Шиффа (альдимин, N-гликозилимин). Нестойкая альдиминная связь легко расщепляется при достижении нормального уровня сахара в крови [12]. Далее основания Шиффа претерпевают в течение нескольких часов/суток обратимую внутримолекулярную перестройку (скорость которой выше, чем скорость гидролиза основания Шиффа) и образуют относительно стабильные продукты Амадори (кетамин, 1-амино-дезоксифруктоза, фруктозамин-белок) [140]. Скорость этого этапа прямо пропорциональна концентрации глюкозы, которая хотя и не является самым активным гликирующим агентом, однако вносит решающий вклад в интенсивность неферментативного гликирования белков благодаря её большому содержанию в крови и внеклеточном матриксе [18]. В дальнейшем продукты Амадори подвергаются дегидратации, циклизации, окислению, кросс-линкингу и полимеризации, что приводит к образованию карбонильных интермедиатов (3-дезоксиглюкозон, глиоксаль и метилглиоксаль), которые обладают более высокой, чем глюкоза, реакционной способностью в реакции гликирования аминокислотных остатков, что значительно увеличивает вероятность модификации белков [9, 18]. Существует несколько путей

образования карбонильных соединений [18]. Путь Вольфа (Wolff) представляет собой аутоокисление глюкозы и других моносахаридов (фруктозы, рибозы, глицеральдегида) с образованием простейшего дикарбонильного соединения глиоксаля. Путь Намики (Namiki) включает распад оснований Шиффа с образованием глиоксаля, МГ, глицеральдегида и 3-дезоксиглюкозона. Путь Ходжа (Hodge) связан с аутоокислением продуктов Амадори, катализируемым ионами металлов с переменной степенью окисления, прежде всего Fe^{2+} . В итоге это приводит к образованию 2,3-дикарбонильного производного продукта Амадори с последующим превращением его в N, ϵ -карбоксиметиллизин (КМЛ) [18]. Затем происходит преобразование продуктов Амадори и карбонильных соединений, связанных с белком, за счет дальнейших изменений углеводных остатков (конформационных перестроек, окислительные превращения) в разнообразные по структуре конечные продукты гликирования (КПГ) или AGEs (advanced glycation end products). Образование КПГ в белках происходит за недели и месяцы, поэтому закономерно их накопление в медленно обменивающихся белках. Накопление КПГ определяется аминокислотным составом белка: наибольшее их количество формируют аминокислоты лизина и аргинина. Различают КПГ, связанные с остатком одной аминокислоты, сшивки между остатками лизина и аргинина в одной или разных молекулах белка [18, 55]. При этом функции белка могут быть нарушены в результате изменения заряда белковой молекулы, её конформации или блокирования активного центра. Таким необратимым изменениям при физиологических температуре и pH подвергаются только долгоживущие белки (такие, как гемоглобины, альбумины, коллаген, кристаллины) [9]. Гликирование – медленная реакция, которая существенно ускоряется при гипергликемии. У пациентов с сахарным диабетом в состоянии гипергликемии содержание гликированного гемоглобина HbA1c в течение 2-3 недель увеличивается в 2-3 раза [12].

Среди КПГ описаны N ϵ -карбоксиметиллизин (КМЛ) и N ϵ -карбоксиэтиллизин, бис(лизил)имидазольные аддукты, имидазолы, пирралин, аргпиримидин, пентозидин, кросслин и весперлизин [55]. Среди них пентозидин,

кросслин и весперлизин являются флуорофорами, причем максимум испускания их флуоресценции ($\lambda_{\text{исп}} = 440 \text{ нм}$) сдвинут в более длинноволновую область относительно флуоресценции остатков триптофана в белках [26]. Это свойство КППГ дает возможность наблюдать за ходом реакции гликирования белков путем измерения флуоресценции при возбуждении на длине волны, характерной для образующихся в процессе гликирования флуорофоров.

В процессе гликирования образуются активные формы кислорода, которые вносят свой вклад в индуцированные гликированием модификации белков, часто называемые «гликоокислением». Этим может объясняться и увеличение накопления КППГ в условиях окислительного стресса и воспаления [9].

Имеются три возможных механизма повреждающего действия на клетки и ткани эндогенных и экзогенных КППГ: активация рецептор-опосредованных сигнальных путей (в основном через специфический рецептор – рКППГ [247]), приводящих к окислительному стрессу, воспалению и модуляции экспрессии генов; изменение структуры и функции стабильных долгоживущих белков, в частности, белков соединительной ткани, за счет необратимого кросслинкинга с КППГ; прямое гликирование внутриклеточных белков и липидов, приводящее к нарушению функций клетки [9].

Образование из хрусталиковых белков агрегатов с высокой молекулярной массой (ВММ) за счет формирования меж- и внутримолекулярных поперечных сшивок, сопровождающихся конформационными преобразованиями, возможно при реакции между КППГ и длительно живущими хрусталиковыми белками [10]. В любом случае производительность этого многоэтапного процесса, известного как реакция Майяра, будет зависеть от уровня и длительности экспозиции глюкозы [56]. Повышенное содержание таких КППГ, как пентозидин, аргпиримидин, глиоксальлизиновый димер, метилглиоксальлизиновый димер, КМЛ, пирралин и др. в хрусталиках при диабетическом катарактогенезе [110]. Повышение содержания КППГ в хрусталике приводит к изменению его цвета и снижению прозрачности [202, 227, 374].

1.3.2. Диабетическая ретинопатия

Связывание КПП, прежде всего, со специфичными рКПП запускает передачу сигналов для запуска множества метаболических, провоспалительных, иммунных, ангиогенных и других ростковых факторов. рКПП – это белок суперсемейства иммуноглобулинов с массой 35 кДа, функционирующий как полигандный трансмембранный связующий агент для нескольких молекул [247]. рКПП конститутивно экспрессируется на эндотелиальных клетках сетчатки, перицитах, микроглии, клетках Мюллера, пигментного эпителия сетчатки (РПЭ), причем его экспрессия увеличивается в условиях сахарного диабета [126]. Взаимодействие КПП/рКПП вызывает генерацию супероксид-аниона НАДФН-оксидазой, ядерную транслокацию NF-κB, что, как следствие, приводит к транскрипции целевых генов, включая факторы роста (VEGF), молекулы адгезии (ICAM-1, VCAM-1), провоспалительные цитокины и хемокины (ИЛ-6, ИЛ-1β, ФНО-α) [424].

Активация оси КПП-рКПП клеток Мюллера вызывает деятельность ключевого сигнального пути MAPK (англ. mitogen-activated protein kinase) – ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase), который по нисходящим путям приводит к производству воспалительных цитокинов, таких как VEGF и моноцитарного хемоаттрактивного протеина-1 (MCP-1), играющие критическую роль в неоваскуляризации и рекрутировании иммунных клеток сетчатки (микроглии) [193]. Активация оси КПП/рКПП может вызывать апоптоз нейронов сетчатки путем активации индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), а также продуцируемый ею NO является одним из медиаторов клеточной гибели [293, 432]. Стимулирование рКПП ганглиозных клеток сетчатки делает их восприимчивыми к КПП-опосредованной провоспалительной передаче сигналов, что может объяснять нейродегенерацию при диабетической ретинопатии (ДР) [321].

Взаимодействие КПП-рКПП увеличивает проницаемость эндотелиальных клеток сетчатки и способствуют разрушению гематоофтальмического барьера (ГОБ) [417]. Высокий уровень КПП в стекловидном теле связан неоваскуляризацией в

сетчатке и переходом непролиферативной ДР в пролиферативную стадию [162, 335].

Аберрантные сшивки между КППГ и ключевыми молекулами внеклеточного матрикса приводят к снижению эластичности и увеличению жесткости сосудов и, как следствие, увеличивают толщину и жесткость стенки сосуда [251, 334]. Гликирование коллагена базальной мембраны сосудов сетчатки отражается на его количественном и качественном составе. Помимо основного коллагена IV типа, перициты начинают синтезировать нехарактерный для них коллаген III типа [214], что приводит к увеличению толщины, снижению эластичности, повышению риска разрывов сосудистой стенки с появлением геморрагий [50].

Потеря перицитов – это один из самых ранних морфологических признаков ДР, что приводит к повреждению эндотелиальных клеток сетчатки, тромбообразованию, появлению бесклеточных капилляров и неоваскуляризации [324]. КППГ, накапливающиеся в культивируемых перицитах, стимулируют продукцию в них избытка активных кислородных радикалов путем активации НАДФ-оксидазы, что вызывает апоптотическую гибель перицитов [260]. К тому же, транскрипционный фактор NF-κB после активации его КППГ и перемещения в клеточное ядро в конечном итоге приводит к активации проапоптотических белков Вах, iNOS и ФНО-α. Пониженное соотношение Bcl-2/Вах впоследствии увеличивает активность каспазы-3, ключевого фермента апоптоза перицитов [70]. Индукция iNOS стимулирует продукцию NO, который является медиатором апоптоза [377]. Производимый перицитами ФНО-α может достигать соседних эндотелиоцитов и переводить их фенотип в провоспалительный и прокоагулянтный, приводящий к закупорке капилляров и апоптозу эндотелиальных клеток [70]. Потерянные перициты оставляют после себя полость в стенке капилляра, известную как призрак перицита, тогда как поврежденные эндотелиальные клетки сетчатки превращаются в бесклеточные капилляры, что в конечном итоге влияет на зрительную функцию [392].

Активация протеинкиназы C (ПКС), вызванная КПП, её субклеточная транслокация и последующее уменьшение белков плотных контактов ZO-1 и ZO-2, способствует увеличению проницаемости эндотелиальных клеток [209].

В условиях стрептозотоцин-индуцированного диабета было показано, что гипергликемия провоцирует провоспалительный фенотип эндотелиальных клеток сетчатки, что сопровождается повышением активности молекул адгезии, таких как ICAM-1 и VCAM-1 [166]. Молекулы межклеточной адгезии, включая ICAM-1 и VCAM-1, способствуют адгезии и трансмиграции лейкоцитов в эндотелий (лейкостаз). Повышенное количество лейкоцитов в сосудистой сети сетчатки у мышей начинается уже через 1 неделю после развития экспериментального диабета [67]. Полиморфноядерные лейкоциты вызывают локальный «окислительный взрыв» за счет гиперпродукции АКМ, повреждающий эндотелиальные клетки, что приводит к тромбообразованию и капиллярной окклюзии [118]. В эксперименте лейкостаз сосудистой сети сетчатки, нарушение гематоофтальмического барьера (ГОБ) и экспрессия ICAM-1 увеличивались как у недиабетических рКПП-трансгенных мышей, так и у мышей со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом, что объясняется авторами сверхэкспрессией рКПП и повышенным взаимодействием КПП/рКПП [208]. Системно введенная растворимая форма рКПП (sRAGE), полученная с помощью бакуловирусной системы экспрессии рекомбинантных белков в клетках насекомых, конкурентно связывала КПП и уменьшала патологические изменения в сосудах сетчатки в обеих экспериментальных группах.

Ось КПП/рКПП/NF-κB стимулирует экспрессию VEGF перицитами и эндотелиоцитами как *in vitro* [72], так и *in vivo* [73]. Предполагается, что блокада рКПП нейтрализует VEGF-опосредованные последствия активации рецептора (ангиогенез и повышенную сосудистую проницаемость при ДР) [274], решая терапевтическую задачу в случае неэффективности ингибиторов ангиогенеза.

1.3.3. Диабетическая катаракта

Хрусталик преимущественно является белковой структурой, так как 35 % массы хрусталика и 85 % его сухого остатка составляют белки [28, 34]. В современной научной литературе, затрагивающей проблемы возрастной и диабетической катаракты, описывается влияние патобиохимических процессов, главным образом, на строение и функции основных водорастворимых белков хрусталика (90 % его сухой массы [28, 34]) – кристаллинов. В- и γ -кристаллины, состоящие из 4 родственных последовательностей «Greek-key» мотивов, образующих бета-витки и формирующие глобулярные домены в N- и C-терминальных областях, относят к одному суперсемейству протеинов. А-кристаллин, имеющий две изоформы (α A- и α B-кристаллины присутствуют в хрусталике в соотношении 3:1 [191]), представляет собой высокогетерогенные олигомерные комплексы с молекулярной массой от 300 до 1200 КДА и средней молекулярной массой около 700 КДА. α и β -кристаллины преобладают в коре хрусталика, а γ -кристаллины – в ядре. По одним данным, самым распространённым в хрусталике является β -кристаллин [38], по другим – α -кристаллин [231]. Именно растворимые цитоплазматические кристаллины обуславливают высокий коэффициент преломления (при этом коэффициент преломления цитоплазмы клеток равен коэффициенту преломления мембран), образуя упорядоченный гель с низким содержанием воды и высокой плотностью стабильных длительно живущих белков, поэтому агрегация кристаллинов из-за формирования поперечных сшивок КПП в комплексы с высокой молекулярной массой (ВММ) приводит к появлению зон светорассеяния и снижению прозрачности хрусталика [176]. Процессу неферментативного гликирования подвергаются долгоживущие белки капсулы хрусталика: ламинин, коллаген IV типа, гепарансульфат протеогликианы [101].

Ведущим фактором, запускающим каскад патобиохимических процессов, составляющих суть диабетического катарактогенеза, является гипергликемия, при которой происходит повышение концентрации глюкозы как во внутриглазной жидкости, так и в хрусталике [28]. Хрусталик является инсулиннезависимой

тканью, поэтому глюкоза из внутриглазной жидкости через капсулу поступает в хрусталик по градиенту концентрации. Основным транспортёром глюкозы в хрусталике является белок ГЛЮТ-1 [249], включая эпителиальные клетки хрусталика (ЭКХ) и хрусталиковые волокна. ЭКХ имеют митохондрии, что обеспечивает активный клеточный метаболизм; 90 % всего потребляемого кислорода хрусталиком расходуется ЭКХ [324]. У хрусталиковых волокон же весьма ограниченные возможности для поддержания гомеостаза и противодействия внешним повреждающим факторам, так как в процессе дифференцировки они теряют клеточные органеллы и полностью зависят от функционирования ЭКХ и состава внутриглазной жидкости [28].

К настоящему времени в хрусталиках были идентифицированы около 30 соединений, что представляет собой подавляющее большинство из известных КПП [167]. Точками воздействия гликирующих агентов на белках хрусталика чаще всего являются гуанидиновая группа остатков аргинина и/или ϵ -аминогруппа остатков лизина [167]. Многочисленные исследования *in vitro*, в которых проводились инкубация экстрактов хрусталиковых белков или изолированных кристаллинов в средах с глюкозой или другими гликирующими агентами, такими, как метилглиоксаль (МГ), демонстрируют заметное увеличение агрегации кристаллинов и повышение содержания КПП [114, 125, 171]. Van Boekel и др. в своем исследовании еще в 1991 г. показали, что при инкубации кристаллинов хрусталика теленка с глюкозо-6-фосфатом увеличилась средняя молекулярная масса всех кристаллинов по данным ряда методов (гель-проникающей хроматографии, электрофореза белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли (SDS-PAGE) и аналитического ультрацентрифугирования) [399]. Karumanchi и др. показали, что α -кристаллин при инкубации с 10 μ M МГ в течение 9 часов при 25°C увеличивал радиус нативных частиц, измеренный методом динамического рассеяния света (фотонной корреляционной спектроскопии), с 18 нм до 350 нм [270]. Рокирес и др. в своем исследовании продемонстрировали, что содержание недифференцированных КПП, определяемое методом конкурентного ИФА с поликлональными антителами к КПП

в человеческих хрусталиках после экстракции катаракты, было в 2 раза выше у пациентов с наличием сахарного диабета, чем при его отсутствии [74]. По данным SDS-PAGE, более высокое содержание белковых агрегатов с ВММ было обнаружено в хрусталиках пациентов с сахарным диабетом, чем в группе сравнения. Причем содержание КПП и процент агрегатов с высокой молекулярной массой (ВММ) имели значительную корреляцию ($r = 0,68$, $P < 0,007$) в группе пациентов с сахарным диабетом. Эта взаимосвязь предполагает, что гликирование белков и образование КПП в хрусталиках при сахарном диабете способствуют формированию белковых агрегатов с ВММ, что составляет основу диабетического катарактогенеза. В работе [142] была сделана попытка с помощью протеомного анализа в эксперименте отдифференцировать изменения, которые происходят с хрусталиковыми белками при сахарном диабете 1 и 2 типа. Авторы отметили, что повышенное содержание белковых агрегатов с ВММ, которые, вероятнее всего, являются гликированными и/или сшитыми кристаллинами, присутствует в хрусталиках в обеих экспериментальных моделях диабетической катаракты. Образовавшиеся в хрусталике вследствие неферментативного гликирования белковые агрегаты с ВММ вызывают светорассеяние, снижение показателя преломления и помутнение хрусталика [141].

Гликирование часто вызывает структурные изменения кристаллинов, которые приводят к снижению конформационной стабильности белков [235], однако гликированные α -кристаллины обладают большей устойчивостью к химическим и термодинамическим воздействиям, чем γ -кристаллины [78, 104]. Более длинная длина волны флуоресцентного излучения γ -кристаллина, находящегося в ядре, предположительно указывает на большее воздействие с гликирующего агента на его ароматические боковые цепи, чем на α -кристаллин [246]. Гликирование, приводящее к снижению pH реакционной среды до 5,0-6,0, дестабилизирует γ -кристаллин, вызывая значительное изменение баланса зарядов в белке. Однако мультимерная структура α -кристаллина обладает наибольшей стабильностью при кислом pH. В этом случае гликирование нейтрализует катионные заряды и способствует конформационной сохранности третичной

структуры α -кристаллинов кортикальных слоев хрусталика. Очищенные белки бычьих хрусталиков после инкубации в среде с глюкозой после секвенирования по Эдману и после, анализа, проведенного методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), показали пептидные последовательности, характерные для γ -кристаллина [425]. Таким образом, вероятно, что основной мишенью для процессов неферментативного гликирования в хрусталике является γ -кристаллин.

В научной литературе α -кристаллины описываются как хрусталиковые белки-шапероны (впервые – J. Horwitz [191]). Таким образом, α -кристаллины препятствуют денатурации и последующей агрегации хрусталиковых белков в результате различных стрессовых факторов, а также способствуют рефолдингу их нативной структуры [34, 38, 342]. При этом шапероноподобной активностью обладают каждая из изоформ α -кристаллина в виде гомоолигомеров. Гликирование α -кристаллина различными гликирующими агентами, включая глюкозу и метилглиоксаль (МГ), приводит к снижению его шапероноподобной активности и к накоплению карбонильных белковых групп и КППГ в хрусталиках, главным образом, КМЛ [231]. При гликировании нативного α -кристаллина МГ в течение 5 дней было обнаружено снижение поверхностной гидрофобности белка и температуры денатурации [262]. Спектроскопия кругового дихроизма выявила преобразование β -листовой структуры в случайную спиральную структуру. Кумар и др. показали, что модификация МГ α -кристаллина увеличивает его конформационную нестабильность и делает менее устойчивым к деградации и протеолитическому расщеплению трипсином и химотрипсином из-за частичного разворачивания структуры [158].

В работе [151], в которой изучался процесс гликирования изолированного α -кристаллина МГ и глиоксалем, были получены аналогичные результаты, к тому же авторы отметили, что гликированный α -кристаллин имел цвет от жёлтого до тёмно-коричневого, похожий на цвет белков, выделенных из катарактальных хрусталиков.

Таким образом, можно сделать вывод, что гликирование α -кристаллина снижает его шапероноподобную активность и способствует диабетическому катарактогенезу [210, 322].

В работе [225], в которой проводились измерения изменённой флуоресценции гликированного α -кристаллина, авторы предлагали использовать аутофлуоресценцию хрусталика как новый неинвазивный способ диагностики сахарного диабета по аналогии с исследованием гликированного гемоглобина.

В ряде исследований было выявлено, что гликирование может способствовать одновременной инактивации нескольких ключевых внутриклеточных ферментов, таких как каталаза, супероксиддисмутаза [426], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа [429], малатдегидрогеназа (MDH) [186], и НАДФ⁺-зависимая изоцитратдегидрогеназа [182].

1.3.4. Офтальмогипертензия при сахарном диабете

С середины 20 века в литературе высказывалось предположение, что коморбидная связь между глаукомой и сахарным диабетом объясняется общностью патобиохимических механизмов, приводящих к повреждению различных структур и нарушению функций глаза при этих заболеваниях [25, 39, 41–42, 349, 422]. Наличие прямой корреляции между сахарным диабетом, длительной гипергликемией и офтальмогипертензией находит новые доказательства в популяционном исследовании (Япония) даже с поправкой на центральную толщину роговицы и сопутствующую патологию у обследуемых [326].

Не до конца выясненным является механизм повышения уровня внутриглазного давления (ВГД) при сахарном диабете [6]. В патогенезе офтальмогипертензии при сопутствующем сахарном диабете имеют значение такие факторы, как окислительный стресс, приводящий к изменению структурных свойств и дренажной функции трабекулы [422], и патологический неоангиогенез в переднем отрезке глаза, развивающийся на фоне пролиферативной диабетической

ретинопатии [267]. Интенсивное гликирование ассоциируется с повышением ВГД у человека [373].

При глаукоме определяется повышение концентрации трансформирующего фактора роста- β (TGF- β) [383], КПП и белковых карбонильных соединений [282], а также уровня глутатиона и супероксиддисмутазы, но снижается суммарная величина реактивного антиоксидантного потенциала (total reactive antioxidant potential (TRAP)) во внутриглазной жидкости [279], что говорит об окислительном стрессе и процессах гликирования и гликоокисления, непосредственно включенных в патогенез заболевания. TGF- β активируется окислительным стрессом [132, 319]. Однако есть данные о положительной корреляционной связи между производством КПП, TGF- β и их соответствующих рецепторов при ремоделировании ткани на фоне сахарного диабета [344], в том числе при таких заболеваниях как диабетическая нефропатия [77, 316] и диабетическая ретинопатия (ДР) [394, 423]. Активизация осей КПП/pКПП и TGF- β /рецептор TGF- β конгруэнтно увеличивает активность матричных металлопротеиназ (ММП) и синтез коллагена IV, а антигликирующий агент аминогуанидин *in vitro* подавляет экспрессию и pКПП, и TGF- β [164]. TGF- β -активированная киназа 1 (TGF- β -activated kinase 1, TAK1) играет важную роль в индуцированной КПП стимуляции митоген-активированных протеинкиназ (MAPKs) и NF- κ B, который регулирует выработку моноцитарного хемотрактантного белка-1 (MCP-1) и ФНО- α в макрофагах [116]. TGF- β увеличивает синтез коллагена III, IV (α -3), V и VI типов, ламинина и фибронектина [285].

Согласно современным представлениям, повышению ВГД предшествуют ультраструктурные нарушения в трабекулярном аппарате глаза, обеспечивающего гидродинамически самый значимый путь оттока внутриглазной жидкости из глаза [23]. Так, по данным электронной сканирующей микроскопии образцов ткани, полученных вовремя трабекулэктомии у пациентов с глаукомой, наблюдается снижение количества, утолщение и слияние соседних трабекулярных пластин из-за потери мезенхимальных клеток трабекулярной сети [372], сужение межтрабекулярных пространств из-за отложения гомогенного материала,

имеющего аморфный или фибриллярный вид, гранул меланина, эритроцитов и макрофагов [340].

Под воздействием TGF- β , концентрация которого во внутриглазной жидкости возрастает при глаукоме [385], происходит повышенное накопление компонентов внеклеточного матрикса, таких как коллаген I, III, IV и VI типов, ламинин, эластин и фибронектин. TGF- β повышает активность тканевой трансглутаминазы, которая вызывает необратимое формирование поперечных сшивок в молекуле фибронектина трабекулы [340], при этом ингибируя активность ММП трабекулярной сети [170]. Таким образом, профибротические эффекты TGF- β приводят к избыточному накоплению компонентов внеклеточного матрикса [205] и ремоделированию трабекулярной сети [319]. Соответственно повышается жесткость трабекулярной сети и снижается ее дренажная функция [351].

У пациентов с сахарным диабетом возможно снижение оттока внутриглазной жидкости [71, 99, 232] как за счет трабекулопатии с нарушением содержания продуктов белкового и углеводного обмена в тканях дренажной системы глаза [25], так и за счет повышения ригидности роговицы [134, 252], что может быть связано с процессом неферментативного гликирования структурных белков (в частности, коллагена), активизированном при сахарном диабете [163, 422] на фоне повышения концентрации глюкозы во внутриглазной жидкости [375].

Учитывая анатомическую близость структур переднего отдела глаза, можно предположить, что повышенное содержание КПП в хрусталиках [10], во внутриглазной жидкости [203], роговице [303] при сахарном диабете сопровождается повышением содержания КПП в трабекуле. Накопление КПП приводит к раннему старению и снижению выживаемости клеток трабекулярной сети, а также усилению продукции ими активных кислородных метаболитов (АКМ), что было показано в эксперименте на культуре клеток, подвергнутых воздействию гликированного сывороточного альбумина в течение 5 дней [283].

1.4. Основные принципы современной фармакотерапии глазных осложнений сахарного диабета

Анти-VEGF (антиангиогенная) терапия стала использоваться в качестве дополнения или альтернативы панретинальной лазеркоагуляции (ПРЛ) сетчатки для лечения пролиферативной диабетической ретинопатии (ДР) и диабетического макулярного отека (ДМО) в конце 2004 г., а в настоящее время занимает лидирующую позицию в лечении нозологии [129, 352]. По данным метаанализа Gao и др. (2020), который включал 12 рандомизированных клинических испытаний (РКИ), пациенты, получавшие монотерапию анти-VEGF препаратами или комбинированное лечение (ПРЛ + анти-VEGF терапия), имеют более высокую остроту зрения, чем пациенты, которым проводилась только ПРЛ сетчатки, при меньших рисках осложнений (гемофтальм, необходимость витрэктомии) [173]. В другом метаанализе, проведенном Fallico и др. (2020), были получены аналогичные результаты [213]. Сравнивая эффективность ПРЛ и анти-VEGF терапии сохраняется даже при двухлетнем применении антиангиогенных препаратов, и анти-VEGF-терапия рекомендуется в качестве терапии первой линии при ПДР [320].

Ранибизумаб представляет собой Fab-фрагмент моноклонального гуманизированного антитела к VEGF и обладает высокой аффинностью [272]. Он избирательно связывается с VEGF-A и предотвращает взаимодействие VEGF-A с его рецепторами на поверхности клеток эндотелия (VEGR-1 и VEGR-2). Афлиберцепт – это рекомбинантный гибридный белок, состоящий из связывающихся с VEGF частей внеклеточных доменов рецепторов VEGFR-1 и VEGFR-2, соединенных с Fc-доменом IgG человека [409]. По сравнению с ранибизумабом афлиберцепт имеет заметно более высокую (примерно в 100 раз) аффинность связывания для VEGF-A₁₆₅ [236]. Эта разница в аффинности может позволить афлиберцепту обеспечить эффективное связывание VEGF-A в течение более длительного времени после инъекции, что потенциально сокращает время между повторными интравитреальными введениями [287]. Афлиберцепт

превосходит по функциональным показателям (по сохранению остроты зрения) стандартную панретинальную лазеркоагуляцию сетчатки в лечении пролиферативной диабетической ретинопатии (ДР) [130]; он более эффективен, чем ранибизумаб и бевацизумаб в лечении диабетического макулярного отека (ДМО), показывая более высокую остроту зрения у пациентов и лучшие анатомические результаты [75, 94, 230]. Афлиберцепт показал свою эффективность при постоянном применении между у пациентов с непролиферативной ДР во временном диапазоне между первым и вторым годом развития заболевания [160].

Частота развития побочных эффектов и осложнений (тромбоэмболии, инфекционный эндофтальмиты, тракционная отслойка сетчатки) анти-VEGF терапии крайне мала и не превышает риски после ПРЛ [92, 95]. Однако в литературе имеются данные о неблагоприятном влиянии ингибиторов ангиогенеза на системный кровоток, повышении рисков инфарктов и инсультов [165, 330, 406], развитии протеинурии и нефротоксичности этих препаратов [388].

Кортикостероиды используются для лечения ранней стадии ДМО, однако их эффективность уменьшается при переходе процесса на позднюю стадию развития макулярного отека [167]. Кортикостероиды эффективны против патологической проницаемости сосудистой стенки и отека сетчатки из-за их способности ингибировать производство простагландинов, лейкотриенов, ферментов и цитокинов [249]. Кортикостероиды влияют на структуру гематоофтальмического барьера (ГОБ) за счет поддержания вазомоторного тонуса и подавления продукции VEGF [324]. Так, флуоцинолон ингибирует продукцию VEGF клетками ретинального пигментного эпителия сетчатки и ФНО- α -индуцированный ангиогенез в хориоаллантоидных мембранах цыплят [101].

Для лечения ДМО обычно используются триамцинолона ацетонид, дексаметазон и флуоцинолона ацетонид. Эти кортикостероиды применяются путем интравитреальной инъекции или введения имплантатов, содержащих различные формы вязкоупругих смесей, суспензий частиц и устройств с медленным высвобождением [114]. РКИ DRCR (Diabetic Retinopathy Clinical Research Network), в котором сравнивалось использование интравитреального

триамцинолона и ранибизумаба с ПРЛ сетчатки, показало более высокую частоту возникновения катаракты (несмотря на повышение остроты зрения) при применении триамценолона [125]. Следовательно, использование кортикостероидов рекомендуется пациентам с ДМО, ранее перенесшим экстракцию катаракты [171]. Клинические исследования, такие как TYBEE, PALADIN, DR-Pro-DEX, MEAD, CHAMPLAIN и FAME, показали повышение скорректированной остроты зрения и уменьшение центральной толщины макулы при интравитреальном введении кортикостероидов пациентам с диабетической ретинопатией. Эти результаты были сопоставимы при лечении ингибиторами ангиогенеза [399].

В настоящее время ведущим методом лечения катаракты, в том числе и диабетической катаракты, является радикальный – хирургическое удаление помутневшего хрусталика различными способами с имплантацией интраокулярной линзы. Поиски антикатарактальных соединений ведутся еще со второй половины прошлого века. Среди современных лекарственных средств для фармакологического ингибирования диабетического катарактогенеза селективно не рассматривается ни один препарат, хотя согласно МКБ-10, диабетическая катаракта классифицируется как отдельная нозологическая единица (шифр H28.0). Согласно литературным источникам, ранее проводилось изучение влияния отдельных лекарственных средств, представленных в Регистре лекарственных средств России (РЛС), на диабетический катарактогенез, в частности таурина и пиреноксина. *Таурин* (2-аминоэтансульфоновая кислота) – серосодержащая аминокислота, образующаяся из метионина и цистеина в печени [253], которую можно назвать относительно незаменимой, так как дефицит таурина в диете является одной из причин формирования катаракты у животных [122], причем у человека весьма низкая способность к биосинтезу таурина [185]. При сахарном диабете содержание таурина снижается в различных органах и тканях, в том числе и в хрусталике [253]. При этом содержание таурина в хрусталике коррелировало обратно пропорционально степени созревания катаракты, в том числе при ДК [248]. В ряде экспериментальных работ была

продемонстрирована способность таурина тормозить диабетический катарактогенез [147, 304]: таурин способствовал снижению накопления малонового диальдегида (МДА) [248] и карбонильных белковых соединений [257], повышению активности каталазы и супероксиддисмутазы, повышал содержание восстановленного глутатиона [257] в хрусталиках диабетических животных. Вероятно, данные факты объясняются наличием у таурина антиоксидантной активности, так как он, предположительно, способен поглощать супероксидный радикал [257].

Пиреноксин конкурентно ингибирует действие хиноидных веществ, продуцируемых в результате аномального метаболизма ароматических аминокислот, стимулирующих превращение водорастворимого белка в хрусталике в нерастворимый, в результате чего вещество хрусталика мутнеет. Хотя данная «хиноидная теория» катарактогенеза имеет определенную критику [17], препарат, действующим веществом которого является пиреноксин, [24] – *Каталин®*, Senju Pharmaceutical, Япония, – также изучался на экспериментальных животных моделях сахарного диабета. В работе [147] было показано, что Каталин при внутривенном или внутривентральном введении крысам с аллоксан-индуцированным диабетом в дозе 20 мг/кг ежедневно в течение 6 недель предотвращал развитие ДК у животных в 100 % случаев, а также снижал у них уровень глюкозы в крови.

Несмотря на это, в клинической практике консервативная терапия катаракты в настоящее время признается малоэффективной [17, 42], но поиск путей фармакологической коррекции катарактогенеза должен быть продолжен с учетом новых данных о патогенезе катаракты.

Основными методами лечения неоваскулярной глаукомы, учитывая вторичность патологического процесса относительно развития неоваскуляризации сетчатки и неэффективность местной гипотензивной терапии, является панретинальная лазеркоагуляция сетчатки и витреоретинальная хирургия – при необходимости проведение операций фистулизирующего или непроницающего типа [374]. Медикаментозная терапия офтальмогипертензии или первичной

открытоугольной глаукомы у пациентов с сахарным диабетом соответствует основным принципам, изложенных в соответствующих клинических рекомендациях МЗ РФ, и проводится лекарственными средствами, относящимися к группе β -адреноблокаторов, аналогов простагландиновых рецепторов EP2 α , симпатомиметиков, ингибиторов карбоангидразы II и др. [41].

1.5. Перспективы применения антигликирующих соединений для фармакологической коррекции отдаленных последствий сахарного диабета, связанных с органом зрения

Несмотря на доказанную роль гликирования в патогенезе различных заболеваний человека, результаты клинических исследований фармакологической блокады этого процесса не привели пока к однозначным результатам [18]. Используемые в клинической практике ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, блокаторы рецепторов ангиотенглавазина II оказывают несущественное влияние на неферментативное гликирование [47].

Собственно антигликирующее действие – конкуренция с молекулами-мишенями гликирования за связывание с моносахаридом, связывание продуктов Амадори и/или карбонильных соединений [18]. Химический антагонизм антигликирующих соединений с моносахаридами и продуктами гликирования основан на способности первых образовывать ковалентные связи с карбонильными группами вторых.

Аминогуанидин чаще других используют в качестве эталонного антигликирующего агента в эксперименте [55]. Он представляет собой гидразиноподобную молекулу, ловушку для карбонильных интермедиатов, тормозит образование карбоксиметиллизина (КМЛ), поперечных сшивок в белке, является неспецифическим ингибитором образования конечных продуктов гликирования (КПГ), ингибирует синтазу оксида азота (NOS) [387]. Ранее были опубликованы данные об ингибирующем влиянии аминогуанидина на диабетический катарактогенез у лабораторных животных, применяемого в виде

капель [150] и внутрибрюшинных инъекций [362]. Есть информация об эффективности аминогуанидина у крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом при развитии диабетической ретинопатии (ДР): иммуногистохимическое окрашивание показало уменьшение накопления конечных продуктов гликирования (КПГ) в сетчатке [90, 245], уменьшение морфологических признаков ДР [226], нормализацию электрофизиологических и гемодинамических параметров [256]. По другим данным, аминогуанидин не обладает собственным влиянием на уровень внутриглазного давления (ВГД) при экспериментальной офтальмогипертензии, не связанной с сахарным диабетом [153]. Однако низкая биодоступность и быстрая почечная элиминация не позволяют создать в жидких средах организма достаточную концентрацию вещества. По данным рандомизированных клинических исследований, не было выявлено статистически значимого положительного влияния аминогуанидина на протекание диабетической нефропатии как при сахарном диабете 1 типа (2003) (но наблюдалось торможение развития диабетической ретинопатии), так и при сахарном диабете 2 типа (1999) [318, 387]. Однако дальнейшие исследования были досрочно прекращены из-за появления большого количества побочных эффектов аминогуанидина, таких как пернициозная анемия, гастроинтестинальные симптомы, волчаночноподобный и гриппоподобный синдромы, васкулит, гломерулонефрит и др. [157, 181, 288, 318, 341].

Производное витамина В6 подавляет образование КПГ и карбонильных интермедиатов путем ингибирования окисления продуктов Амадори [192]. Введение пиридоксамина крысам при экспериментальном сахарном диабете снижает прогрессирование ДР [216]. Клинические испытания пиридоксамина в настоящее время продолжается, однако они нацелены на диабетическую нефропатию [339].

Растворимые рКПГ (sRAGE) конкурентно предотвращают связывание рКПГ с их лигандами [371]. Вводимые внутрибрюшинно в течение 14 дней растворимые рКПГ уменьшали лейкостаз в микроциркуляторном русле сетчатки, снижали

проницаемость сосудистой стенки и экспрессию ICAM-1 в сетчатке как у диабетических мышей, так и у rКПГ-трансгенных мышей [208].

Согласно опубликованным за последние 5 лет научным данным, размещенным на научных интернет-ресурсах (PubMed, Web of Science, Medline, eLibrary.Ru), ведется экспериментальное изучение влияния антигликирующих веществ растительного происхождения на поздние глазные осложнения сахарного диабета. Так, Xueshuantong (стандартизированный продукт, полученный из китайского женьшеня [423]), метанольный экстракт шипината [350], этанольный экстракт *Osteomeles schwerinae* C.K. Schneid, травяная комбинация *Cinnamomi Ramulus* и *Paeoniae* [378], Tanshinone IIa (основной липофильный компонент *Salvia miltiorrhiza* [370]), активные компоненты *Tanacetum parthenium* [81] показали положительное влияние на ДР у лабораторных животных с экспериментальным сахарным диабетом путем ингибирования воспаления, апоптоза, потери перицитов, активации маркеров окислительного стресса, перекисного окисления липидов, матричных металлопротеиназ (ММП), iNOS, ангиогенеза и накопления КПГ в сетчатке. Сульфорафан, содержащийся в растениях семейства крестоцветных, задерживают КПГ-индуцированный апоптоз клеток в линии фоторецепторов сетчатки [358].

В работе по изучению антикатарактального эффекта карнозина (β -alanine-L-histidine) [227] авторы показали, что карнозин уменьшал метилглиоксаль-индуцированное структурное повреждение кристаллинов. Было показано, что добавление лиофилизированных цианобактерий *Aphanothese sacrum* в рацион крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом приводило к снижению содержания КМЛ в хрусталиках [96]. Авторы отметили, что содержание КМЛ в хрусталиках коррелировало со степенью развития помутнений в хрусталиках диабетических животных.

Было изучено влияние цинка на диабетический катарактогенез: крысы со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом получали диету, обогащённую цинком [109]. Результаты показали, что цинк, добавленный в рацион, ингибирует образование катаракты у диабетических животных, что

сопровождается снижением потери растворимости белков хрусталика, уменьшением накопления активных кислородных метаболитов (АКМ), малонового диальдегида (МДА), карбонильных групп белков, КПП, белковых агрегатов с высокой молекулярной массой (ВММ), снижение экспрессии рКПП, альдозоредуктазы (АР), кальпаина в хрусталиках. Авторы отметили, что при диабетическом катарактогенезе наблюдается сверхэкспрессия α -кристаллина и белковых фракций с ВММ, однако цинк снижал эти показатели, вероятно, за счёт ингибирования окислительного стресса в хрусталике, взаимодействия иона цинка с α -кристаллином, что приводит к образованию соединения с низкой константой диссоциации. Последнее, предположительно, приводит к стабилизации структуры α -кристаллина в условиях избытка глюкозы в хрусталике и к поддержанию его шапероноподобной активности.

Влияние L-лизина на шапероноподобную активность α -кристаллина, которое проявлялось в задержке термоиндуцированной агрегации каталазы, описано в работе [299]. Лизин снижал образование КПП и агрегатов с ВММ, активность АР, но повышал активность каталазы и супероксиддисмутазы в хрусталиках у диабетических крыс.

Описано получение и экспериментальное изучение влияния авторегенеративной редокс-наночастицы, которая представляет собой CeO₂ NPs, покрытую PEG-PLGA (PCNPs), на развитие диабетической катаракты при подкожном введении [108]. Было выявлено, что PCNPs адсорбирует АКМ, оказывая тем самым протекторное действие на эпителий хрусталика, ингибирует гликирование α -кристаллина, что позволяет сохранить его шапероноподобную активность, повышает концентрацию восстановленного глутатиона и снижает содержание белковых карбонильных групп белков, МДА и пентозидина.

В экспериментах *in vitro* флавоноиды: кемпферол, таксифолин и кверцетин (kaempferol, taxifolin, quercetin) – при добавлении к хрусталикам, инкубированным в среде с повышенным содержанием глюкозы, приводят к снижению накопления в хрусталиках КПК, белковых карбонильных групп, торможению образования агрегатов с ВММ, ингибируют АР [141]. Водный экстракт *Amaranthus gangeticus* L.

снижал накопление КПП, метилглиоксаля и активных кислородных метаболитов в линии эпителиальных клеток хрусталика человека, инкубированных в среде с высоким содержанием глюкозы [98]. Кроцины (апокаротиноиды) повышали уровень глутатиона и активность каталазы в хрусталиках диабетических крыс [210]. Исследование *in vitro* показало, что кроцины ингибируют гликирование и агрегацию α -кристаллина, восстанавливают его шапероноподобную активность, уменьшают флуоресценцию КПП и накопление белковых агрегатов с ВММ.

Создавшееся положение в фармакологической коррекции поздних осложнений сахарного диабета, связанных с органом зрения, определяет актуальность поиска соединений с целью разработки высокоэффективных корректоров данных состояний.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Регулирующие документы

Экспериментальная работа проводилась в соответствии с «Принципами надлежащей лабораторной практики» и требованиями приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики (GLP) от 1 апреля 2016 года № 199н» и со статьей 11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Миронов А.Н., 2012) и была одобрена Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный номер IRB0005839 IORG0004900 (протокол № 2093-2019 от 18 июня 2019 года).

Все процедуры с животными в исследовании проводились в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей. Моделирование экспериментальных патологий осуществлялось согласно руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [52].

2.2. Реактивы и вещества

В качестве потенциальных антигликирующих соединений были изучены 12 новых производных азоло[5,1-С]-1,2,4-триазина под лабораторными шифрами АВ и IS в концентрации 10^{-3} М. Новые химические соединения были синтезированы в ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина» (г. Екатеринбург).¹

Дальнейшим объектом исследования являлось соединение-лидер по антигликирующей активности под лабораторным шифром АВ-19 (натриевая соль

¹ Выражаем искреннюю признательность д. х. н., член-корр. РАН, заведующему кафедрой органической и биомолекулярной химии УрФУ им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, профессору В. Л. Русинову.

диэтилового эфира 4-оксо-1,4-дигидропирозололо[5,1-С]-1,2,4-триазин-3,8-дикарбоновой кислоты, моногидрат) [47].

В качестве вещества сравнения использовался аминугуанидина гидрохлорид (Sigma-Aldrich, США).

Фармакологические реактивы, используемые в исследовании: стрептозотозин (Sigma, США), физиологический раствор (ООО «Мосфарм» Россия), хлоралгидрат (Panreac Química S.L.U., Испания), двухфазный инсулин «ХУМУЛИН МЗ» (Eli Lilly, Франция), цитрат натрия (ч.д.а., Реахим, Россия), бычий сывороточный альбумин (БСА) фракции V (BioWest, Франция), азид натрия (Эском, Россия), диметилсульфоксид (ДМСО) (Fisher Scientific, США), натрия цитрат (Реахим, Россия), натрий фосфорнокислый двузамещенный, натрия хлорид 0,9 % (Эском, Россия), лимонная кислота (ДиазМ современная лаборатория, Россия), гематоксилин Майера (Россия), эозин-флоксин водный раствор (Россия), парафиновая среда Histomix (Россия), 1 % раствор тропикамида («Мидриацил», Acclon, США)

2.3. Оборудование и программное обеспечение

Для исследований было использовано следующее оборудование: аквадистиллятор ДЭ-4-2 (ЗАО «Электромедоборудование», Россия, Саранск) спектрофлуориметр F-7000 (Hitachi, Япония), рН-метр (ОНАУС, США), бактерицидная УФ-лампа (Liston, Россия), весы аналитические (ОНАУС, США), весы прецизионные (ОНАУС, США), проточный бактерицидный рециркулятор воздуха (BioSan, Латвия), глюкометр Глюкокард Сигма, тест-полоски Глюкокард Сигма Мини (Аркрэй, Россия), офтальмологический ветеринарный тонометр Tonovet (Icare, Финляндия), многофункциональный микропланшетный ридер Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия), коммерческий набор для определения КПП «ELISA Kitfor Advanced glycation endproducts» (Cloud Clone, Китай), микроскоп AxioScope A1, оборудованном цифровой камерой AxioCam MRc5 (Zeiss, США), одноканальные дозаторы переменного объема (0,5–10, 10–100, 100–1000 мкл) (ЗАО

«Термо Фишер Сайентифик», Россия) роговичный серебряный электрод, игольчатые электроды EL452, EL450, датчика игольчатого типа TSD-144, стробоскоп TSD122A, стимулятор STM200, программно-аппаратный комплекс Biopac-systems MP-150 с компьютерной программой AcqKnowledge 4.2 (Biopac System, Inc., США), портативной щелевой лампе Digital hand-held slit lamp (США), магнитная мешалка IKARH basic 2 («ИКА», Германия).

Химическая и лабораторная посуда, пробирки (Россия); зонд металлический атравматичный (Россия); планшеты 96-луночные черные с плоским дном; медицинские инструменты для энуклеации глазного яблока животных: ножницы, скальпели, пинцеты (Россия); ватные тампоны, бинты, салфетки (Россия); шприцы однократного применения разного объема; наконечники к дозаторам переменного объема (Eppendorf AG, Германия).

2.4. Экспериментальные животные

В качестве экспериментальных животных использовали 120 крыс-самцов линии Спрег-Доули в возрасте 8 недель массой 260-280 г (ООО «НПК БиоТех», г. Москва), 6 кроликов породы Шиншилла массой 3-3,5 кг (Питомник ИП глава К (Ф)Х Бабичева Т.М, Волгоградская обл.), нелинейных мышей-самок массой 21-24 г, 36 нелинейных беспородных мышей-самцов массой 18-22 г, 30 5-6 месячных морских свинок (самцы и самки) массой 220-300 г (ООО «НИЦБМТ» г. Москва).

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 № 51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», правилами лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 351.000.3-96 и 51000.4- 96), Приказу МЗ и СР РФ от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики», директивой 2010/63/EU Европейского парламента и

Совета Европейского союза от 22.09.2010 г по охране животных, используемых в научных целях.

2.5. Исследование антигликирующей активности соединений

Реакцию гликирования воспроизводили по методу А. Jedsadayanmata [31, 221]. Конечный объем реакционной смеси составлял 1,5 мл. Реакционная смесь содержала растворы бычьего сывороточного альбумина (1мг/мл) и глюкозы (500mM) в фосфатном буфере (pH 7,4). Для предупреждения бактериального роста в буферный раствор вносили азид натрия в конечной концентрации 0,02 %. Все вещества растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). В экспериментальные образцы добавляли 50 мкл раствора изучаемых веществ в различных концентрациях, в контрольные образцы добавляли растворитель в аналогичном объеме. Все экспериментальные образцы инкубировали в течение 24 часов при 60°C. По истечении срока инкубации проводили измерение специфической флуоресценции гликированного бычьего сывороточного альбумина (БСА) на спектрофлуориметре F-7000 (Hitachi, Япония) при длине волны возбуждения 370 нм и испускания 440 нм [26].

Для наиболее перспективного соединения были изучены концентрационные зависимости антигликирующей активности и рассчитаны показатели концентраций IC_{50} , вызывающих снижение флуоресценции гликированного бычьего сывороточного альбумина на 50 %.

С целью объяснения причин выявленных закономерностей и создания условий для целенаправленного синтеза новых высокоэффективных антигликирующих соединений была изучена взаимосвязь химических свойств и антигликирующей активности.

2.6. Исследование острой токсичности

Изучение острой токсичности наиболее активного соединения и вещества сравнения аминогуанидина проводили согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [52]. Острую суточную токсичность определяли на белых нелинейных мышах-самках массой 21-24 г при внутрибрюшинном введении. Величину токсикологического показателя LD_{50} рассчитывали по методу Миллера и Тейтнера [8]. Расчёт показателей эффективной концентрации IC_{50} и LD_{50} проводили методом регрессионного анализа. В качестве показателя широты терапевтического действия использовали условный терапевтический индекс (УТИ), который рассчитывали как отношение величины LD_{50} к IC_{50} .

2.7. Исследование нейротоксикологического профиля в комплексе тестов по S. Irwin

Изучение нейротоксикологического профиля соединения АВ-19² проводилось по модифицированной методике S. Irwin на беспородных белых мышах-самцах массой 18-22 г [27, 336]. В ходе исследования было сформировано 6 экспериментальных групп (n=6) – 1 контрольная и 5 опытных. Исследуемые вещества вводили внутривенно металлическим зондом. Животные контрольной группы получали дистиллированную воду из расчета 100 мкл на 10 г веса. Изучение нейротропных свойств субстанции АВ-19 проводилось в нарастающих дозах, начиная с ЭД₅₀ 20 мг/кг, и дозах, превышающих эффективную дозу в 5, 10, 20 и 50 раз. Для изучения психосоматических реакций проводили оценку следующих параметров: поведенческие реакции (вокализация, настороженность, пассивность, стереотипия, агрессия, беспокойство, груминг, спонтанная двигательная реакция), нервно-мышечные эффекты (реакции на боль,

² Выражаем искреннюю благодарность к. б. н., доценту кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ Д. В. Мальцеву.

прикосновение, реакция на стук, подергивания, судороги, тремор, тонус конечностей, расстройство походки) и вегетотропные эффекты (птоз/экзофтальм, размеры зрачка, уринация, дефекация, саливация, цвет кожи, частота дыхания и ректальная температура). Для оценки данных параметров использовалась 8-балльная шкала S. Irwin. Показатели состояния животных в норме приравнивались к 4 баллам. Однако для некоторых показателей, отсутствующих у животных (вокализация, стереотипия, беспокойство, агрессия, тремор, подергивание, судороги, расстройство походки и саливация), за норму принималось 0 баллов, а изменения фиксировались в диапазоне от 0 до 4 баллов. Изменение параметра на 25 % приравнивалось к 1 баллу. Возрастание изменений функционально-поведенческого статуса от 4 до 8 баллов указывает на увеличение эффекта, снижение от 4 до 0 баллов характеризуется уменьшением эффекта.

Уровень изменений фиксируемых показателей оценивали через 60 и 120 мин после введения веществ. Прогнозировали доклиническую степень безопасности соединения и определяли минимальную токсическую дозу (ТД_{мин}).

Статистическая обработка полученных данных проводилась при помощи программы GraphPad Prism 5.0. с применением теста Краскела-Уоллиса с посттестом Даннетта.

2.8. Методы изучения специфического фармакологического действия

2.8.1. Моделирование сахарного диабета 1 типа

Для исследования была выбрана модель сахарного диабета (СД), вызванного однократным введением стрептозотоцина лабораторным крысам,³ которая описывается в литературе как адекватная и экспериментально обоснованная модель для тестирования терапевтических методов коррекции поздних осложнений сахарного диабета у людей [384].

³ Выражаем искреннюю признательность к. м. н., доценту кафедры фармакологии и биоинформатики Р. А. Литвинову.

Стрептозотоцин является цитотоксином, избирательно проникающим в панкреатические β -клетки при помощи глюкозного транспортера типа 2 (ГЛЮТ2). Панкреатотоксичность стрептозотоцина объясняется его алкилирующим действием, которое вызывает фрагментацию дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК) β -клеток. В ответ на нарушение правильной структуры ДНК активируется поли(АДФ-рибоза)полимераза, которая истощает внутриклеточные запасы НАД⁺ и АТФ. Таким образом, запускается некроз β -клеток. Повреждение клеток поджелудочной железы обусловлено пероксинитритом (ONOO⁻), который синтезируется из оксида азота, источником которого является нитрозогруппа стрептозотоцина. Разрушение β -клеток поджелудочной железы приводит к развитию недостаточности инсулина и гипергликемии. В связи с этим для моделирования экспериментального СД и его поздних осложнений практикуют внутривенное введение лабораторным животным раствора стрептозотоцина.

К недостаткам хирургической модели относятся необходимость проведения операционных действий (полной или частичной панкреатомии), чаще у крупных лабораторных животных, наиболее высокий процент летальности, риск инфекционных осложнений, сложно прогнозируемый уровень гипергликемии [48, 62]. К недостаткам генетических моделей относятся высокая стоимость, глубокий врожденный иммунодефицит, отсроченное развитие клинической картины диабета (на 12 неделе заболевания у ВВ-крыс (BioBreeding rats), на 18-20 неделе заболевания у мышей NOD (Non-Obese Diabetes)), наличие сопутствующих заболеваний (сиалоаденит, тиреоидит, гемолитическая болезнь), существенные отличия иммунных систем грызунов и человека, связанных главным образом с главным комплексом гистосовместимости [48, 62]. При этом модели химически-индуцированного сахарного диабета выглядят более подходящими под цель эксперимента в изучении влияния нового антигликирующего соединения на развития осложнений в относительно недолгой перспективе. В то же время стрептозотоцин обладает меньшей нефро- и гепатотоксичностью, чем аллоксан, а онкогенное действие стрептозотоцина (образование инсулиномы почки или

печени) не успеет реализоваться, учитывает предполагаемую длительность эксперимента.

В качестве вещества сравнения был выбран аминогуанидина гидрохлорид, как известный ингибитор образования конечных продуктов гликирования (КПГ) белков *in vitro* и при экспериментальном моделировании осложнений сахарного диабета [90].

Соединение АВ-19 изучалось в эффективной дозе 20 мг/кг, установленной по результатам предшествующих исследований специфической фармакологической активности. Аминогуанидин вводили в дозе 50 мг/кг, выбранной в соответствии с литературными данными [384, 348]. Введение изучаемого соединения и вещества сравнения осуществлялось крысам внутривентрикулярно однократно, в утреннее время посредством атравматичного металлического зонда.

В качестве растворителя соединения АВ-19 и аминогуанидина использовалась дистиллированная вода. АВ-19 и вещество сравнения аминогуанидин вводились животным после разведения в дистиллированной воде внутривентрикулярно один раз в сутки в течение 3 мес. в соответствии с рекомендациями Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств [52].

При формировании групп проводился клинический осмотр, оценка внешнего вида, общего состояния здоровья, выявление смертности, оценка пищевой и питьевой активностей.

В исследованиях *in vivo* на модели осложнений сахарного диабета, индуцированного стрептозотоцином, из включенных в эксперимент животных сформировали 4 группы по 15 особей в каждой. В контрольную группу 1 включали интактных крыс без СД, которым вводился растворитель. В экспериментальные группы со СД, индуцированным стрептозотоцином, включали животных с уровнем глюкозы в крови > 15 ммоль/л. Началом введения тестируемых образцов животным с экспериментальным СД являлся 7 день после введения стрептозотоцина.

1. Контрольная группа № 1 – интактные животные, получавшие курсовое (90 дней) внутривентрикулярное введение (с помощью металлического

атравматичного зонда) дистиллированной воды в объеме 1 мл/100 г веса 1 раз/сутки – 15 крыс (самцы);

2. Контрольная группа № 2 – животные с экспериментальным СД, получавшие курсовое (90 дней) внутрижелудочное введение (с помощью металлического атравматичного зонда) дистиллированной воды в объеме 1 мл/100 г веса 1 раз/сутки – 15 крыс (самцы);

3. Опытная группа № 1 – животные с экспериментальным СД, получавшие курсовое (90 дней) внутрижелудочное введение соединения АВ-19 в эффективной терапевтической дозе 20 мг/кг (объем 1 мл/100 г веса) 1 раз/сутки – 15 крыс (самцы);

4. Опытная группа № 2 – животные с экспериментальным СД, получавшие курсовое (90 дней) внутрижелудочное введение вещества сравнения аминугуанидина в дозе 50 мг/кг (объем 1 мл/100 г веса) 1 раз/сутки – 15 крыс (самцы).

Экспериментальный СД вызывали введением стрептозотоцином, введенным внутривенно в дозе 45 мг/кг по методу Tancredi и др. [527]. Раствор стрептозотоцина готовили в 0,1 моль/л цитратном буферном растворе (рН 4,5). Для приготовления буфера готовили 0,1 М растворы лимонной кислоты и цитрата натрия. Для приготовления раствора лимонной кислоты ($M_r = 192,1$) растворяли 19,21 г в 1000 мл. лимоннокислый натрий*5,5 H_2O ($M_r = 357$) 0,1 М = 35,7 г /1000 мл.

Для получения 0,1 М цитратного буфера необходимого рН смешивали 0,1 М раствора лимонной кислоты и цитрата натрия по следующей схеме:

рН	0,1 М Лимонная кислота (мл)	0,1 М Цитрат натрия (мл)
4,6	8,9	11,1

После этого титровали раствор до рН 4,5 с помощью 0,1 М раствора лимонной кислоты. Хранили при +4 °С.

Навеску стрептозотоцина готовили в зависимости от общей массы тела экспериментальных животных: $m(\text{стрептозотоцина}) = 45 \text{ мг/кг} * m(\text{животных}) (\text{кг})$.
Общий объем растворителя рассчитывали на общую массу экспериментальных животных: $V (\text{мл}) = m(\text{животных}) (\text{кг})$.

Перед введением стрептозотоцина животных отсаживали на ночное голодание в течение 12-14 ч при сохранении свободного доступа к воде. Животных взвешивали. Рабочий раствор стрептозотоцина готовили в темном стекле непосредственно перед введением животным и во время введения хранили на холодоэлементе.

Для осуществления внутривенной инъекции стрептозотоцина помещали крысу в специальный фиксатор, и раствор стрептозотоцина вводили в хвостовую вену как можно дистальнее.

Для снижения риска смертности от гипогликемии в первые сутки после введения стрептозотоцина вместо питьевой воды животные получали 5 % раствор глюкозы.

В ходе эксперимента в утренние часы до обновления корма производилось измерение уровня глюкозы (глюкометр глюкокард Сигма, тест-полоски Глюкокард Сигма Мини). Первое измерение концентрации глюкозы в крови проводили через сутки после введения стрептозотоцина. После чего всем животным с уровнем глюкозы $> 19,4 \text{ ммоль/л}$ для снижения риска смерти от кетоацидоза назначали двухфазный инсулин («ХУМУЛИН М3»; комбинация инсулинов короткого (30 %) и средней (70 %) продолжительности действия). Введение инсулина осуществлялось подкожно в область холки животного строго в период времени 15:00–17:00 в дозе 1-4 ЕД по следующей схеме: при уровне глюкозы $> 19,4 \text{ ммоль/л}$ – 1 ЕД инсулина, $> 25 \text{ ммоль/л}$ – 2 ЕД, $> 30 \text{ ммоль/л}$ – 3 ЕД, $> 33,3$ – 4 ЕД.

Второе измерение концентрации глюкозы в крови осуществляли через семь суток после введения стрептозотоцина. После этого проводили распределение животных по группам и начинали введение изучаемых веществ.

Корректировку дозы инсулина производили 1 раз в неделю после контрольного определения концентрации глюкозы в крови экспериментальных животных.

По данным разных литературных источников, смертность крыс в результате формирования стрептозотоцин-индуцированного СД варьирует в диапазоне 25–52 %. В связи с этим для затравки готовили избыточное количество лабораторных животных, для того чтобы к истечению срока эксперимента (12 недель) до финальных манипуляций выжило достаточное для статистической обработки результатов количество крыс.

Данные об абсолютном количестве животных, принимавших участие в эксперименте, их смертности и развитии СД представлены в Таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Данные об абсолютном количестве лабораторных животных в эксперименте, их смертности и развитии сахарного диабета

Группа	Исходное количество животных	Количество животных с развившимся сахарным диабетом	Количество животных, погибших во время эксперимента	Количество животных, данные которых включены в результаты исследования
Контрольная группа № 1 (интактные)	15	-	-	15
Контрольная группа № 2 (сахарный диабет)	15	14	4	10
Опытная группа № 1 (сахарный диабет + АВ-19 в дозе 20 мг/кг)	15	14	3	11
Опытная группа № 2 (сахарный диабет + амингуанидин в дозе 50 мг/кг)	15	13	2	11

2.8.2. Определение влияния соединения АВ-19 на содержание гликированного гемоглобина

Гликированный гемоглобин (HbA1c) является основным показателем для оценки компенсации СД и верификации риска развития микро- и макрососудистых осложнений [20]. Эритроциты, циркулирующие в крови, имеют разный возраст, поэтому для усредненной характеристики уровня в крови глюкозы ориентируются на полупериод жизни эритроцитов – около 60 сут. Таким образом, содержание гликированного гемоглобина дает представление о том, какой была гликемия в предшествующие исследованию 1,5–2 мес.

Определение содержания HbA1c в крови крыс через 3 мес. после развития экспериментального сахарного диабета выполнено с помощью набора реагентов для определения HbA1c «ДИАБЕТ-ТЕСТ» в соответствии с прилагаемой инструкцией производителя.

Подготовка реагентов

– Рабочий буферный раствор 1

Предназначен для уравнивания микроколонок и элюции негликированного гемоглобина.

Содержимое одного флакона с раствором 3 переносили в мерную колбу вместимостью 500 мл. В эту же колбу добавляли 300-400 мл дистиллированной воды, а также содержимое одного флакона с раствором 4.

– Рабочий буферный раствор 2

Необходим для элюции гликированного гемоглобина.

Содержимое другого флакона с раствором 3 переносили в мерную колбу вместимостью 500 мл. В эту же колбу добавляли 300-400 мл дистиллированной воды, а также содержимое одного флакона с раствором 4 и содержимое флакона с сорбитолом. Перемешивали до полного растворения осадка и доводили объем дистиллированной водой до метки 500 мл и вновь тщательно перемешивали.

– Регенерирующий раствор

Предназначен для удаления сорбитола и белков с сорбента.

Содержимое флакона с раствором 5 переносили в мерную колбу вместимостью 1000 мл, добавляли 500-700 мл дистиллированной воды, перемешивали, доводили объем дистиллированной водой до метки 1000 мл, после чего вновь тщательно перемешивали.

– Консервирующий раствор

Предназначен для консервации сорбента.

Содержимое флакона с раствором 6 переносили в мерную колбу вместимостью 500 мл, добавляли 300–400 мл дистиллированной воды, перемешивали, доводили объем дистиллированной водой до метки 500 мл, после чего вновь тщательно перемешивали.

Приготовление образцов крови для анализа

Для определения HbA1c готовили гемолизаты крови животных. Для этого 20 мкл крови внести в пробирку, содержащую 200 мкл раствора 2, а затем перемешать в течение 1–2 мин. Образцы гемолизатов могут храниться при температуре 4-8 °С в течение одной недели.

Проведение анализа

1. Рабочий буферный раствор 1 нагреть до температуры 25 °С. Промаркировать два ряда пробирок для каждого анализируемого образца (А и Б).
2. Достать микроколонки из холодильника. Снять в первую очередь верхнюю крышку, затем нижний колпачок и слить консервирующий раствор. Внести в микроколонки по 5 мл регенерирующего раствора и дать жидкости стечь. Затем прилить по 5 мл рабочего буферного раствора 1 и дать жидкости стечь.
3. Вставить микроколонки в пробирки А и выдержать 15-20 мин при комнатной температуре.
4. В микроколонки нанести на верхний фильтр по 100 мкл исследуемых гемолизатов, выдержать 1–2 мин, затем в микроколонки внести по 100 мкл рабочего буферного раствора 1 и выдержать 3–5 мин.
5. Внести в микроколонки по 10 мл рабочего буферного раствора 1 и дать жидкости стечь.

6. Микроколонки переместить в пробирки Б. Внести в микроколонки по 5 мл рабочего буферного раствора 2 и дать жидкости стечь.

7. Вынуть микроколонки из пробирок.

8. В микроколонки внести по 4,5 мл регенерирующего раствора и дать жидкости стечь. Затем внести по 4,5 мл рабочего буферного раствора 1 и дать жидкости стечь. Микроколонки готовы для проведения следующего анализа.

9. Растворы из пробирок А и Б поместить в кювету спектрофотометра и измерить оптическую плотность при длине волны 414 нм, используя в качестве образца сравнения дистиллированную воду.

10. Содержимое HbA1c рассчитать по формуле:

$$\%HbA1c = \frac{ОП_{414}(Б) \cdot 100}{ОП_{414}(Б) + [2,04 \cdot ОП_{414}(А)]},$$

где ОП₄₁₄(Б) – оптическая плотность фракции Б при 414 нм;

ОП₄₁₄(А) – оптическая плотность фракции А при 414 нм;

2,04 – пересчетный коэффициент, зависящий от объема фракций А и Б;

100 – пересчетный коэффициент для вычисления процентного содержания.

Регистрация полученных параметров осуществляется с заполнением таблицы первичных данных, которые для последующей обработки переносятся с в таблицу программы Microsoft Excel.

2.8.3. Измерение внутриглазного давления

Измерение внутриглазного давления (ВГД) проводили методом отскоковой тонометрии с помощью офтальмологического ветеринарного тонометра Tonovet (Icare, Финляндия), не требующего предварительной анестезии роговицы, согласно инструкции производителя.

2.8.4. Биомикроскопическое исследование хрусталика

Для прижизненного исследования хрусталиков лабораторных животных проводили осмотр глаз крыс в режиме ретроиллюминации на портативной щелевой лампе Digital hand-held slit lamp (США) с фоторегистрацией изображения в условиях максимального медикаментозного мидриаза, вызываемого тропикамидом (1 % раствор). Для оценки степени помутнения хрусталиков использовали модифицированную классификацию Suryanarayana и др. [136]:

0 баллов – прозрачный хрусталик;

1 балл – минимальная непрозрачность в центре хрусталика (наличие небольшого количества субкапсулярных вакуолей);

2 балла – очаговые помутнения в центре и по периферии хрусталика («туманное» помутнение коры);

3 балла – помутнение всего хрусталика (плотное помутнение ядра и «туманное» помутнение коры);

4 балла – зрелая катаракта – плотное помутнение коры и ядра хрусталика.

2.8.5. Измерение уровня глазной микроциркуляции с помощью лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ)

Регистрацию осуществляли с использованием программно-аппаратного комплекса Biopac-systems MP-150 и датчика игольчатого типа TSD-144 (США), программы AcqKnowledge 4.2., согласно инструкции производителя [29, 115]. В результате проведения исследования были получены данные М в каждой конкретной точке измерения – среднее значение показателя микроциркуляции – средний поток крови в заданном интервале времени, в перфузионных единицах (ПЕ), характеризующий гемомикроперфузию ткани.

Исследование выполняли, согласно ранее описанной методике [29]. После введения лабораторного животного в наркоз оценку уровня микроциркуляции проводили бесконтактно в 2 мм от поверхности глаза в десяти точках по

окружности в 2 мм от лимба. Продолжительность записи в каждой точке составляла 20 секунд. Зондирующее лазерное излучение позволяет получить отраженный сигнал из слоя ткани толщиной до 1 мм, а объем зондируемой ткани составляет 1 мм³. Суммарная толщина склеры, сосудистой оболочки глаза и сетчатки у крысы составляет менее 0,5 мм, использование ЛДФ позволяет оценить уровень микроциркуляции по всей глубине зондируемой области [29, 314, 335]. Учитывая принципиальную схему кровоснабжения глазного яблока крысы [44, 45], особенность проведения ЛДФ переднего отрезка глаза [22], данное исследование позволяет оценить уровень перфузии в бассейне задних длинных цилиарных артерий и передних цилиарных артерий.

Из значений уровня микроциркуляции в каждой точке из десяти точек рассчитывалось среднее арифметическое, которое принимали за значение уровня глазной микроциркуляции у данного лабораторного животного. Уровень глазной перфузии в экспериментальной группе рассчитывался как среднее арифметическое из значений, полученных у каждого животного в группе.

2.8.6. Исследование биоэлектрической активности сетчатки с помощью электроретинографии

Принцип электроретинографии (ЭРГ) заключается в регистрации биопотенциалов нейронов сетчатки как ответ на световой стимул. Оценку функционального состояния сетчатки проводят по ряду параметров, наиболее значимыми из которых являются амплитуды а- и b- волн. За функциональное состояние фоторецепторов отвечает негативная а-волна, генерируемая их наружными сегментами. За активность биполярных и мюллеровских клеток, с возможным вкладом горизонтальных и амакриновых клеток, - позитивная b-волна [60]. Согласно данным литературы, при развитии диабетической ретинопатии отмечается снижение амплитуды волн электроретинограммы как у людей, так и у экспериментальных животных [19, 63, 154, 199, 239], что свидетельствует о дисфункции и последующей дегенерации нейронов и нейроглии сетчатки.

В настоящее время отсутствует международный стандарт проведения ЭРГ у лабораторных животных, однако данное электрофизиологическое исследование было выполнено в условиях максимально соответствующих рекомендациях Международного общества электрофизиологии зрения (Standard for full-field clinical electroretinography, ISCEV, 2022) и адаптировано под возможности используемой техники фирмы Biopac System, Inc. (США) [432].

ЭРГ проводили сразу после регистрации уровня микроциркуляции. Для этого животным инстиллировали 1 % раствор тропикамида («Мидриацил», Aclon) для получения максимального мидриаза. Затем крысы подвергались темновой адаптации в течение 20 мин. Далее крыс фиксировали на столике, изолированном от электромагнитного излучения. Роговичный серебряный электрод (активный) помещали на роговицу, на которую предварительно инстиллировался изотонический раствор натрия хлорида для более полного контакта. Референтный игольчатый электрод EL452 (минус) помещали подкожно в области черепа. Заземляющий игольчатый электрод EL450 помещали подкожно в области основания хвоста. Стробоскоп TSD122A со вспышкой белого света продолжительностью 30 мкс и энергией вспышки 180 мДж, подключенный к стимулятору STM200 фирмы Biopac System, Inc. (США), размещали за спиной животного, регистрацию ЭРГ проводили в ответ на одиночную стимуляцию. Вызванные биопотенциалы пропускались на частоте 1-1000 Гц, усиливались, усреднялись и представлялись графически на экране при помощи Biopac-systems MP-150 с компьютерной программой AcqKnowledge 4.2 (США). Таким образом запись ритмической ЭРГ проводили в течение 0,5 с у каждой крысы в группах. Учитывая преобладание в сетчатке крыс палочек (до 97 % фоторецепторов), проведение ЭРГ в скотопических условиях представляется наиболее показательным в эксперименте [19].

Для оценки степени развития функциональных повреждений сетчатки высчитывали соотношение амплитуд b- и a-волн – интегральный ЭРГ-индекс b/a, который устойчив к индивидуальным особенностям электрогенеза сетчатки и условиям, связанным с различными типами электродов, что позволяет сравнивать

данные различных лабораторий [46, 64]. Из полученных значений в каждой группе выводили среднее, которое вносили в протокол.

2.8.7. Патоморфологическое исследование хрусталиков

После эвтаназии лабораторных животных под наркозом, вызванном хлоралгидратом, введенным в дозе 400 мг/кг внутривенно, глазные яблоки были энуклеированы. Правое глазное яблоко каждого лабораторного животного использовалось для патоморфологического исследования, а левое – для определения содержания в хрусталике конечных продуктов гликирования (КПГ) и отдельно – карбоксиметиллизина (КМЛ).

При проведении патоморфологических исследований для фиксации глазного яблока использовали свежеприготовленный модифицированный раствор Давидсона [169]. Далее материал обезвоживали в батарее спиртов восходящей крепости и заключали в парафиновую среду Histomix. С полученных блоков на микротоме получали срезы толщиной 4-6 мкм и монтировали их на предметные стекла. Срезы окрашивали гематоксилином и эозин-флоксином по стандартной методике [37]. Микропрепараты изучали и фотографировали на микроскопе AxioScore A1, оборудованном цифровой камерой AxioCam MRc5.

Для оценки степени катаракты использовали балльную систему⁴:

0 баллов – признаки катаракты отсутствуют;

0,5–1 балл – начальные признаки субкапсулярной или кортикальной катаракты, проявляющиеся вакуолизацией и набуханием волокон хрусталика;

1,5–2 балла – локальные проявления катаракты, выражающиеся в гиперплазии эпителиальных клеток под капсулой (субкапсулярная) или набуханием волокон хрусталика (кортикальная);

⁴ Выражаем искреннюю благодарность д. м. н., профессору, заведующему кафедрой патологической анатомии ВолгГМУ А. В. Смирнову.

2,5–3 балла – выраженная кортикальная катаракта с дефрагментацией и набуханием волокон, образованием морганиевых телец;

3,5–4 балла – кортикальная катаракта, охватывающая весь хрусталик (дефрагментация и набухание волокон, наличие «баллонных клеток», морганиевых телец по всему периметру хрусталика);

4,5–5 баллов – ядерная катаракта (гиалиноз).

2.8.8. Морфометрическая оценка линейной клеточной плотности ганглиозного слоя сетчатки крыс⁵

Срезы сетчатки делали на расстоянии 1 мм от височного края диска зрительного нерва, окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Микропрепараты изучали при 40-кратном увеличении. Морфометрический показатель структурных изменений в сетчатке – линейная клеточная плотность (ЛКП) ганглиозного слоя сетчатки крыс рассчитывался как количество ядер клеток ганглиозного слоя сетчатки на 100 мкм (ядер/100 мкм) в поле зрения. В каждом микропрепарате оценивалось по 4 поля зрения. При описании параметров выборки центральную тенденцию характеризовали с помощью медианы (Me), которая при малом объеме выборки и отклонениях одномодального распределения от нормального в наилучшей степени соответствует генеральному среднему. Для оценки вариабельности показателей указывали интерквартильный интервал (Q1-Q3), где Q1 – 25 перцентиль, Q3 – 75 перцентиль. Наличие различий между выборками проверяли путем попарного сравнения выборок с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни.

⁵ Выражаем искреннюю благодарность д. м. н., профессору, заведующему кафедрой патологической анатомии ВолгГМУ А. В. Смирнову.

2.8.9. Определение содержания конечных продуктов гликирования и карбоксиметиллизина в кристаллах

Определение общего содержания конечных продуктов гликирования (КПГ) и карбоксиметиллизина (КМЛ) в кристаллах проводили в соответствии с методом [197]. Количество КПГ и КМЛ в супернатантах измеряли иммуноферментным методом с помощью коммерческого набора «ELISA Kit for Advanced glycation endproducts» (Cloud Clone, Китай) в соответствии с инструкцией производителя на многофункциональном микропланшетном ридере Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия).

2.8.10. Исследование деформируемости эритроцитов

2.8.10.1. Моделирование сахарного диабета 1 типа

Для изучения выбрана модель сахарного диабета 1 типа, вызванного внутривенным введением стрептозотоцина лабораторным животным в дозе 45 мг/кг (подробно методика описана в пункте 2.7.1) [384]. В качестве экспериментальных животных использовали самцов крыс линии Спрег-Дули в возрасте 8 недель. В качестве вещества сравнения выбран амингуанидина гидрохлорид как известный ингибитор образования КПГ белков *in vitro* и при экспериментальном моделировании осложнений сахарного диабета [90].

Соединение АВ-19 изучалось в эффективной дозе 20 мг/кг, установленной по результатам исследования специфической фармакологической активности. Амингуанидин вводили в дозе 50 мг/кг, выбранной в соответствии с литературными данными [348, 384]. Введение изучаемого соединения и вещества сравнения осуществлялось крысам внутрижелудочно однократно, в утреннее время посредством атравматичного металлического зонда.

В качестве растворителя соединения АВ-19 и амингуанидина использовалась дистиллированная вода. АВ-19 и вещество сравнения амингуанидин вводились животным после разведения в дистиллированной воде

внутрижелудочно один раз в сутки в течение 3 мес. в соответствии с рекомендациями Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств [52].

При формировании групп проводился клинический осмотр, оценка внешнего вида, общего состояния здоровья, выявление смертности, оценка пищевой и питьевой активностей.

В исследованиях *in vivo* на модели осложнений сахарного диабета (СД), индуцированного стрептозотоцином, из включенных в эксперимент животных сформировали 4 группы по 15 особей в каждой. В контрольную группу 1 включали крыс без СД, которым вводился растворитель. В экспериментальные группы со СД, индуцированным стрептозотоцином, включали животных с уровнем глюкозы > 15 ммоль/л. Начало введения тестируемых образцов животным с экспериментальным СД – через месяц после введения стрептозотоцина.

Контрольная группа 1 – интактные животные, получавшие однократное внутрижелудочное введение (с помощью металлического атравматичного зонда) дистиллированной воды в объеме 1 мл/100 г веса 1 раз/сутки – 15 крыс (самцы);

Контрольная группа 2 – животные с экспериментальным СД, получавшие однократное внутрижелудочное введение (с помощью металлического атравматичного зонда) дистиллированной воды в объеме 1 мл/100 г веса 1 раз/сутки – 15 крыс (самцы);

Опытная группа 1 – животные с экспериментальным СД, получавшие однократное внутрижелудочное введение соединения АВ-19 в эффективной терапевтической дозе 20 мг/кг (объем 1 мл/100 г веса) 1 раз/сутки – 15 крыс (самцы);

Опытная группа 2 – животные с экспериментальным СД, получавшие однократное внутрижелудочное введение вещества сравнения аминугуанидина в дозе 50 мг/кг (объем 1 мл/100 г веса) 1 раз/сутки – 15 крыс (самцы).

2.8.10.2. Метод получения крови у животных со стрептозотоцин-индуцированным диабетом

Через 1 ч 40 мин после введения соединения АВ-19 и аминогуанидина проводилась наркотизация крыс хлоралгидратом в дозе 400 мг/кг внутривентриально. Спустя 10 мин после подачи наркоза животное фиксировалось на специальной доске спиной вниз. Производилось послойное вскрытие брюшной полости с последующим выделением брюшной аорты. Стерильным, промытым 3,8 % водным раствором цитрата натрия, шприцем объемом 5 мл осуществлялся забор крови из брюшной аорты. Кровь переливалась в пластиковую пробирку с 3,8 % водным раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Для перемешивания крови с цитратом проводилось немедленное 3-4-кратное аккуратное переворачивание закрытой пробирки после ее заполнения до требуемого объема. При этом не допускалось образование пены.

2.8.10.3. Изучение влияния соединения АВ-19 и аминогуанидина на деформируемость эритроцитов, обработанных глиоксалем. Моделирование нарушения деформируемости эритроцитов *in vitro*

В настоящем исследовании использовались 6 кроликов породы Шиншилла в качестве доноров крови. Все исследуемые вещества тестировались на крови каждого из кроликов с инкубацией непосредственно *in vitro*, с целью устранения влияния индивидуальных особенностей организма отдельного кролика. В случае болезни животного производилась замена данного животного на другое из дополнительного состава.

Перед началом забора крови кролика фиксируют в специальных боксах. Забор крови производят из краевой ушной вены кроликов методом свободного падения капли и стабилизируют 3,8 % водным раствором цитрата натрия (рН 6,0) в соотношении 9:1. Для перемешивания крови с цитратом необходимо

немедленное 3–4-кратное аккуратное переворачивание закрытой пробирки после ее заполнения до требуемого объема. При этом не допускается образование пены.

Соединение АВ-19 и амингуанидин исследовались в концентрациях 5 мМ, 2.5 мМ, 1 мМ. Глиоксаль в кровь добавляли в концентрации 1 мМ. Введение соединения АВ-19, амингуанидина и глиоксаля в указанных концентрациях осуществлялось дозатором непосредственно в кювету с тест-системой (содержащую стандартизированные образцы крови).

Из полученных проб крови были сформированы группы для тестирования образцов:

Контрольная группа 1 (6 проб – по одной на каждом кролике).

Контрольная группа 2 (в кровь добавляли 10 мкл 1 мМ глиоксаля, инкубация 15 мин при температуре 37 °С, 6 проб – по одной на каждом кролике).

Опытная группа 3 (в крови добавлялся 10 мкл 1 мМ глиоксаля, инкубация 15 мин при температуре 37 °С, после чего добавляли соединение АВ-19 в концентрации 5 мМ, инкубация 10 мин при температуре 37 °С, 6 проб – по одной на каждом кролике).

Опытная группа 3 (в кровь добавляли 10 мкл 1 мМ глиоксаля, инкубация 15 мин при температуре 37 °С, после чего добавляли соединение АВ-19 в концентрации 2,5 мМ, инкубация 10 мин при температуре 37 °С, 6 проб – по одной на каждом кролике).

Опытная группа 3 (в кровь добавляли 10 мкл 1 мМ глиоксаля, инкубация 15 мин при температуре 37 °С, после чего был добавляли соединение АВ-19 в концентрации 1 мМ, инкубация 10 мин при температуре 37 °С, 6 проб – по одной на каждом кролике)

Опытная группа 4 (в кровь добавляли 10 мкл 1 мМ глиоксаля, инкубация 15 мин при температуре 37 °С, после чего был добавлен амингуанидин в концентрации 5 мМ, инкубация 10 мин при температуре 37 °С, 6 проб – по одной на каждом кролике).

Опытная группа 4 (в кровь добавляли 10 мкл 1 мМ глиоксаля, инкубация 15 мин при температуре 37 °С, после чего был добавлен амингуанидин в

концентрации 2,5 мМ, инкубация 10 мин при температуре 37 °С, 6 проб – по одной на каждом кролике).

Опытная группа 4 (в кровь добавляли 10 мкл 1 мМ глиоксаля, инкубация 15 мин при температуре 37 °С, после чего добавлялся амингуанидин в концентрации 1 мМ, инкубация 10 мин при температуре 37 °С, 6 проб – по одной на каждом кролике).

2.8.10.4. Определение индекса деформируемости эритроцитов в проточной микрокамере

Из цельной крови клетки получали центрифугированием. Их отмывали три раза в изотоническом растворе NaCl с добавлением 5 мМ глюкозы.

Деформируемость эритроцитов крови оценивали по индексу элонгации при фиксированном напряжении сдвига в проточной микрокамере (Рисунок 2.1.) [14]. Ее заполняли суспензией эритроцитов (0,5 %) в изотоническом растворе NaCl, содержащем 0,1 % альбумина, и помещали на предметный столик микроскопа. В микрокамеру подавали давление, которое создавала в ней определенную величину напряжения сдвига (длина микрокамеры – 3,5 см, ширина – 0,95 см, а высота – 120 мкм). Величина напряжения сдвига (τ) в камере рассчитывалась по формуле:

$$\tau = 6\eta Q/Wh^2,$$

где η – вязкость суспензии (примерно – 1,0 мПа*с), Q – объемная скорость в микрокамере, W – ширина проточного канала микрокамеры, h – высота канала, равная толщине прокладки (стандартная полиэтиленовая пленка от 100 до 120 мкм).

Изображение растянутых потоком жидкости, прикрепленных одной точкой к поверхности микроканала эритроцитов передавалось через USB порт в компьютер с помощью цифрового окуляра (модель DCM500) (Рисунок 2.2.).

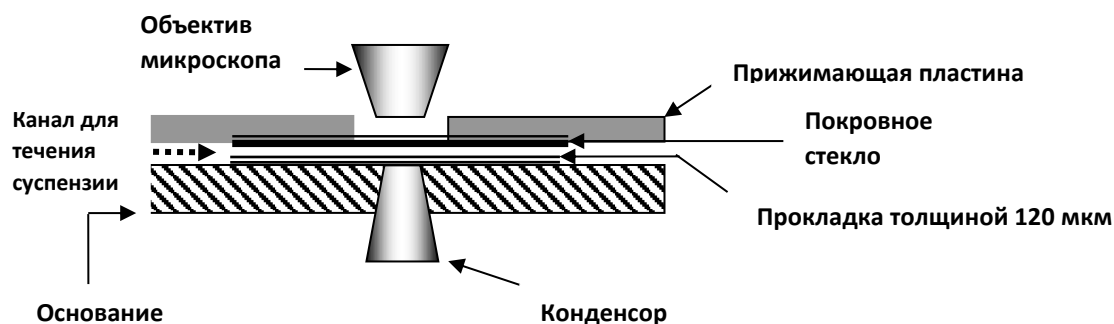
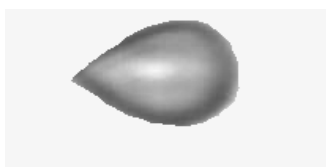


Рисунок 2.1 – Схема проточной микрокамеры для регистрации степени деформации эритроцитов в сдвиговом потоке



$$\text{ИУЭ} = (L - W) / (L + W)$$

Рисунок 2.2 – Эритроцит, закрепленный одной точкой и деформированный в сдвиговом потоке ($\tau = 0,78 \text{ Н*м}^{-2}$) (Муравьев А.В., 2003)

После «захвата» и записи изображения его анализировали в программе Photoshop, где определяли длину и ширину деформированных клеток (около 100) и рассчитывали индекс удлинения как показатель деформации:

$$\text{ИУЭ} = (L - W) / (L + W)$$

где L – длина деформированной клетки, W – ее ширина.

Статистическую обработку цифрового материала проводили, используя табличный редактор Microsoft Excel.

2.8.11. Исследование местнораздражающего действия

Соединение АВ-19 было использовано в дозах эквивалентных поступающим в организм животного при ЭД50 или 10-кратной ЭД50 (соответственно, 0,2 % и 2 % суспензий) для проведения конъюнктивальной пробы.

2.8.11.1. Проведение конъюнктивальной пробы

Конъюнктивальная проба является высокочувствительным методом определения местнораздражающего действия [52]. Тест является более чувствительным, чем исследование, проведенное на ороговевающем эпителии, и является методикой углубленного изучения возможного скрытого местнораздражающего действия вновь синтезированного соединения.

Достижение цели исследования было возможно только при проведении его с использованием животных. Для изучения местнораздражающего действия соединения АВ-19 были выбраны морские свинки, как вид, рекомендованный «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» и общепринятый для данного этапа доклинических исследований [52]. Количество животных в исследовании было достаточным для полноценной оценки и интерпретации полученных результатов и соответствовало рекомендациям, изложенным в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [52]. Исследование было проведено на половозрелых 5–6-месячных морских свинках (самцах и самках) массой 220–300 г (ООО «НИЦБМТ», г. Москва). Животные содержались в стандартных условиях, в соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 № 51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218–14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» с естественным световым режимом на

полнорационнoй сбалансированнoй по содержанию питательных веществ диете для лабораторных животных, согласно ГОСТ Р50258-92.

Животных распределяли по экспериментальным группам с помощью метода рандомизации, используя в качестве критерия массу тела, так чтобы индивидуальное значение массы не отклонялось от среднего значения более чем на $\pm 10 \%$.

В исследовании определяли местнораздражающее действие соединения АВ-19 при однократном введении под верхнее веко глаза морских свинок. 0,2 % или 2 % суспензии соединения АВ-19 однократно вводили глазной пипеткой под верхнее веко правого глаза, а под верхнее веко левого (контрольного) глаза вводили дистиллированную воду. Животные из контрольных групп 1 и 2 получали эквивалентный объем растворителя. Реакцию учитывали через 15 мин, 24 и 48 ч, оценивая в баллах по следующей шкале [491]:

- 1 – легкое покраснение слезного протока;
- 2 – покраснение слезного протока и склеры в направлении к роговице;
- 3 – покраснение всей конъюнктивы и склеры, реакция сопровождается почесыванием, возможно развитие гнойного воспаления.

Экспериментальные группы:

Исследуемая группа 1: аппликация 0,2 % суспензии соединения АВ-19 – 5 морских свинок (самцы);

Исследуемая группа 2: аппликация 0,2 % суспензии соединения АВ-19 – 5 морских свинок (самки);

Исследуемая группа 3: аппликация 2 % суспензии соединения АВ-19 – 5 морских свинок (самцы);

Исследуемая группа 4: аппликация 2 % суспензии соединения АВ-19 – 5 морских свинок (самки);

Контрольная группа 1 (отрицательный контроль): аппликация дистиллированной воды – 5 морских свинок (самцы);

Контрольная группа 2 (отрицательный контроль): аппликация дистиллированной воды – 5 морских свинок (самки).

2.9. Методы статистической обработки

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью табличного редактора Microsoft Excel 2013 и программы GraphPad Prism 5,0 (США). Соответствие полученной выборки нормальному распределению данных осуществляли с применением теста Колмогорова - Смирнова. Сравнение двух независимых выборок осуществляли с использованием t-критерий Стьюдента и непараметрического U-критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферонни. Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. НАПРАВЛЕННЫЙ ПОИСК АНТИГЛИКИРУЮЩИХ СОЕДИНЕНИЙ

Неферментативное взаимодействие белков с глюкозой или реактивными дикарбонильными интермедиатами приводит к образованию различных конечных продуктов гликирования (КПГ) [9]. Внутри- и внеклеточное накопление КПГ является одним из основных механизмов патогенеза таких заболеваний, как атеросклероз [4], сердечная недостаточность, воспаление, ревматоидный артрит [4], остеоартрит, нейродегенеративные заболевания [4], включая болезни Альцгеймера и Паркинсона.

Интенсивность неферментативного гликирования растет при сахарном диабете и имеет немаловажное значение в развитии его осложнений [55]. Скорость образования КПГ зависит от уровня и длительности экспозиции глюкозы [7]. Поскольку гликирование происходит в течение длительного периода времени, особенно значимым является влияние КПГ на долгоживущие белки (коллаген IV типа, миелин, тубулин, активатор плазминогена 1, фибриноген, кристаллины). Накопление КПГ во внеклеточном матриксе приводит к образованию меж- и внутримолекулярных поперечных сшивок и повышению ригидности стенок кровеносных сосудов. Под действием КПГ изменяется состав внеклеточного матрикса, связанные с повышенной экспрессией фибронектина, коллагена III, IV, VI типов и ламинина, активацию ключевых профибротических цитокинов (трансформирующий фактор роста β , фактор роста соединительной ткани).

Рецептор-зависимые эффекты КПГ опосредованы их взаимодействием со специфическими рецепторами, что приводит к активации вторичных передатчиков, таких как протеинкиназа C (ПКС). Ключевая мишень рКПГ – ядерный фактор NF- κ B, который транслоцируется в ядро, вызывая модуляцию экспрессии генов, кодирующих полипептидную последовательность таких белков, как молекулы межклеточной адгезии-1, E-селектина, эндотелина-1, сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), провоспалительных цитокинов.

Вышеперечисленные эффекты избыточного образования КПГ находятся в основе патогенеза таких осложнений сахарного диабета, как диабетический атеросклероз, нефро-, нейро-, ретино-, кардио-, ангиопатии, которые являются причинами инвалидизации и смертности среди пациентов с сахарным диабетом.

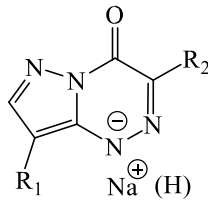
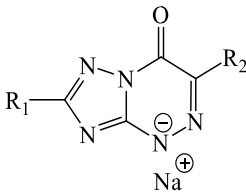
Среди препаратов, применяемых в клинической практике, имеются средства (ингибиторы АПФ и блокаторы рецепторов АТ II), ингибирующие образование КПГ, однако их антигликирующая активность невелика [47]. Интерес к данной проблематике и поиску лекарственных средств, способных тормозить реакцию Майяра и предотвращать развитие осложнений сахарного диабета, неуклонно растет. Первым и наиболее изученным веществом, ингибирующим гликирование белков, является аминогуанидин. Он предотвращает формирование флюоресцирующих КПГ и глюкозо-производных поперечносшитых молекул коллагена. Механизм антигликирующего действия аминогуанидина связывают с его способностью захватить реактивные дикарбонильные интермедиаты. Однако клинические испытания данного препарата были оставлены на III фазе клинических испытаний в связи с его недостаточной эффективностью и наличием побочных эффектов.

Все вышеперечисленное объясняет повышенный интерес к поиску антигликирующих соединений, так как препаратов, ингибирующих реакцию Майяра и разрешенных для применения в клинической практике, в настоящее время не существует.

3.1. Влияние производных азоло[5,1-С]-1,2,4-триазина на неферментативное гликирование белков

В ходе проведенных исследований были изучены 12 соединений под лабораторными шифрами АВ и IS на способность подавлять неферментативное гликирование белков. В результате исследования было выявлено, что все изучаемые соединения проявили антигликирующую активность в различной степени выраженности (Таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Антигликирующая активность производных азоло[5,1-С]-1,2,4-триазина in vitro

№ п/п	Шифр соединения	R ₁	R ₂	Антигликирующая активность (ингибирование флуоресценции гликирования БСА), Δ % (M±m), 10 ⁻³ M
Пиразолотриазины				
				
1	AB-15	CN	COOEt	30,64±2,92*
2	AB-16	CH	NO ₂	50,41±10,86
3	AB-19	COOEt	COOEt	88,76±0,92*
4	AB-20	COOEt	NO ₂	79,76±4,23*
5	AB-41	COONa	COONa	37,91±4,81*
6	AB-46	COOEt	NH ₂	-22,01±11,12
Триазолотриазины				
				
7	IS 215	H	COOEt	66,92±2,67*
8	IS 218	Set	COOEt	24,21±6,91
9	IS 219	SPr	COOEt	28,57±2,61*
10	IS 221	CH ₃	COOEt	16,65±7,01
11	IS 223	Si-Pr	COOEt	31,69±7,05
12	IS 256	COOEt	COOEt	29,96±11,56
13	Аминогуанидин			57,83±0,58*

Примечания: *-данные достоверны по отношению к положительному контролю (U-критерий Манна-Уитни, p<0.05).

Наибольшую активность проявили соединения AB-19, AB-20 и IS-215 снижая специфическую флуоресценцию гликированного БСА на 79,76 %, 89,86 % и 66,92 % соответственно и превосходя по активности аминогуанидин. Соединения AB-15, AB-41 и IS-219 достоверно снижали специфическую флуоресценцию

гликированного БСА на 30,64 %, 37,91 % и 28,57 % соответственно, уступая по своей активности аминугуанидину. В концентрации 10^{-3} М соединения АВ-16, IS-218, IS-221, IS-223, IS-226 имели тенденцию снижения флуоресценции гликированного БСА, а соединений АВ-46 не оказывал влияние на данный параметр.

По итогу произведенного скрининга среди производных азоло[5,1-С]-1,2,4-триазина было выявлено, что наиболее эффективными являются соединения под лабораторными шифрами АВ-19 и АВ-20.

Далее по ходу исследования была изучена зависимость антигликирующего эффекта наиболее активных соединений от их концентрации (Таблица 3.2). На основании данных результатов для соединений АВ-19, АВ-20 и аминугуанидина были рассчитаны показатели концентрации веществ, которые вызывают снижение флуоресценции гликированного БСА на 50 % (IC_{50}). Так, показатели IC_{50} для наиболее активных веществ составили 53,96 μ М (АВ-19) и 338,55 (АВ-20), а для аминугуанидина – 765,00 μ М. Таким образом наилучший показатель был выявлен у соединения АВ-19, которое по величине IC_{50} в 14 раз превосходило аминугуанидин. Для данного соединения был экспериментально определен токсикологический показатель LD_{50} (Таблица 3.3).

Таблица 3.3 – Показатели острой токсичности (LD_{50}), ингибирующей концентрации (IC_{50}) и условного терапевтического индекса (УТИ) соединения АВ-19 и аминугуанидина

Шифр	IC_{50} , mM	LD_{50} ,mM	LD_{50} ,мг/кг	УТИ
АВ-19	0,05396	1,534	518,412	28,42
Аминугуанидин	0,765	5,089	562,566	6,65

Таблица 3.2 – Зависимость антигликирующего эффекта соединения АВ-19 от концентрации.

п/п	Шифр	Антигликирующая активность (ингибирование флуоресценции гликированного БСА), Δ % (M±m)									IC ₅₀ ,μM
		Концентрация, μM									
		1000	750	500	250	100	75	50	25	10	
1	АВ-19	91,75±0,42*	91,04±0,39*	87,56±0,34*	78,53±0,76*	62,06±1,36*	51,50±2,43*	40,29±1,71*	39,98±6,64	27,60±5,37	53,96
2.	АВ-20	87,32±1,78*	86,95±1,69*	72,00±3,67*	48,50±10,02	1,31±15,30	-36,96±18,65	-19,00±10,58	-17,29±8,71		338,55
3.	Амино-гуанидин	58,08±0,72*	50,25±1,08*	38,75±1,52*	19,14±2,24*	3,53±2,31*	-	-	-	-	765,00

*-данные достоверны по отношению к положительному контролю (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$).

В результате было установлено, что показатель среднелетальной дозы для данного соединения составил 518 мг/кг. Далее в ходе исследования был выполнен расчет условного терапевтического индекса (УТИ), по величине которого вещество АВ-19 превосходило аминогуанидин в 4,27 раза.

Таким образом, соединение АВ-19 является перспективным для дальнейшего исследования.

3.2. Зависимость антигликирующей активности соединений от их химической структуры

В данной работе была изучена зависимость антигликирующей активности новых 12 соединений, относящихся к производным азоло[5,1-С]-1,2,4-триазина, от их химической структуры.

Подструктурный анализ влияния типа ядра производных азолотриазинов на уровень антигликирующей активности показал, что наиболее активные соединения относятся к классу пиразоло[5,1-С]-1,2,4-триазинов. Меньшую активность продемонстрировал класс триазоло[5,1-С]-1,2,4-пиразинов.

Так, в ряду пиразоло[5,1-С]-1,2,4-триазинов наибольшую антигликирующую активность проявляет соединение, имеющее этоксикарбонильный заместитель в положении С³ и С⁸ (АВ-19). Замена этоксикарбонильного радикала в положении С³ на нитрогруппу (АВ-20) приводит к незначительному снижению антигликирующей активности. При этом аминогруппа в положении С³ в данном ряду соединений приводит к инверсии антигликирующего эффекта (АВ-46).

Замена этоксикарбонильной группы в С⁸ на этинильный радикал и цианогруппу приводит к снижению антигликирующей активности (АВ-16, АВ-15). Следует отметить, что включение в положении С³ и С⁸ карбоксильной группы вместо этоксикарбонильной приводит к снижению антигликирующей активности (АВ-41).

В ряду производных триазоло[5,1-С]-1,2,4-пиразинов этоксикарбонильный радикал в С³ обеспечивает антигликирующую активность. (IS-215). Однако

введение в положение C^7 какого-либо радикала приводит к снижению антигликирующей активности изопропилтио (IS-223) > этоксикарбоксылльной (IS-256) > пропилтио (IS-219) > этилтио (IS-218) > этил (IS-221).

Таким образом, наибольшую активность проявили производные пиразоло[5,1-С]-1,2,4-триазина. Наличие этоксикарбонильной группы в C^3 гарантирует проявление антигликирующей активности как для производных пиразолотриазина, так и для триазотриазинов.

3.3. Заключение

В результате проведенного исследования было выявлено, что антигликирующая активность новых производных азоло[5,1-С]-1,2,4-триазина находится в зависимости от их химической структуры. Для проявления наибольших антигликирующих свойств имеет значение строение заместителей в положении C^3 , C^7 и C^8 у исследуемых соединений. Более активными из них по антигликирующей активности оказались пиразоло[5,1-С]-1,2,4-триазины. При этом наличие этоксикарбонильной группы в C^3 гарантирует проявление антигликирующей активности как для производных пиразолотриазина, так и для триазолотриазинов.

В результате проведенного скрининга новых производных азоло[5,1-С]-1,2,4-триазина выявлено, что наиболее активными являются соединения АВ-19 и АВ-20. Для данных соединений и препарата сравнения – аминугуанидина была изучена зависимость антигликирующего эффекта от концентрации веществ и рассчитаны показатели IC_{50} . Полученные данные позволили выявить для дальнейшего углубленного изучения соединение АВ-19.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ГЛАЗ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ И ИХ КОРРЕКЦИЯ СОЕДИНЕНИЕМ АВ-19 И АМИНОГУАНИДИНОМ

При неконтролируемой гипергликемии сахарный диабет сопровождается развитием осложнений, таких, как диабетическая ретинопатия, катаракта и неоваскулярная глаукома. При этом сахарный диабет 1 типа характеризуется ранним развитием и быстрым прогрессированием хронических осложнений [54, 159, 298].

Одним из основных механизмов патогенеза поздних осложнений сахарного диабета является процесс неферментативного гликирования белков, а именно необратимый кросслинкинг КППГ с длительно живущими белками, имеющими низкую скорость метаболизма, такими, как гемоглобин, коллаген и кристаллины, что сказывается на их свойствах и, следовательно, изменяет характеристику структур, строительными компонентами которых они являются (сосудистая стенка, эритроциты, хрусталик, трабекулярная сеть, стекловидное тело, склера, роговица и т. д.) [10, 20, 74, 135, 142, 151, 152, 158, 167, 176, 203, 210, 214, 225, 235, 251, 279, 322, 334, 417, 425]. Помимо прямого влияния на строительные белки и ферменты (снижение их каталитической активности) [182, 426, 429], запуск рецептор-опосредованных (pКППГ) сигнальных путей вызывает: производство активных кислородных метаболитов (АКМ), что влечет за собой эндотелиальную дисфункцию, а с учетом цитотоксичности АКМ - и апоптоз перицитов, эндотелиальных клеток (как следствие, повышается проницаемость гематоофтальмического барьера), фоторецепторов, ганглиозных клеток сетчатки, нейроглии, эпителиальных клеток хрусталика и т.д. [1, 69, 278, 327, 390]; продукцию провоспалительных цитокинов и молекул адгезии, что приводит к лейкостазу и образованию бесклеточных капилляров в сетчатке [112, 193, 290, 292, 317, 327, 331, 368, 381, 419]. Также КППГ стимулируют образование эндотелиального фактора роста (VEGF), который запускает патологический

неоангиогенез, что утяжеляет течение диабетической ретинопатии [72, 73, 325, 333, 424].

В результате проведенного скрининга новых производных азолотриазина выявлено соединение – лидер по антигликирующей активности с лабораторным шифром АВ-19. Целесообразным является дальнейшее изучение его влияния на течение и скорость прогрессирования глазных осложнений сахарного диабета, накопление КПП в структурах глаза в условиях *in vitro*.

4.1. Влияние соединения АВ-19 на содержание гликированного гемоглобина в крови у крыс при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете

Уровень гликемии у лабораторных животных из контрольной группы № 1 (СД) уже на третий день после введения стрептозотоцина превышал 20 ммоль/л и оставался достоверно высоким, превосходя аналогичный показатель у интактных крыс (Таблица 4.1). В группах животных, получавших аминугуанидин и соединение АВ-19, уровень глюкозы на протяжении эксперимента оставался достоверно высоким, по сравнению с группой интактного контроля.

Развитие тяжелой формы экспериментального сахарного диабета (при уровне глюкозы в крови 18 ммоль/л и более) характеризовалось изменением состояния крыс. Диабетические крысы худели, у них развивалась полиурия, полидипсия, полифагия – клинические признаки, характерные для тяжелой формы диабета. Животные были вялыми и апатичными.

По результатам данного этапа исследования было установлено, что у животных с СД из группы контроля к концу 3 мес. исследования уровень HbA1c в крови оказался повышен и статистически значимо ($p < 0,05$) превышал соответствующий уровень HbA1c у крыс из группы интактного контроля в 2,38 раза (Таблица 4.2). Введение исследуемого соединения АВ-19 приводило к снижению данного показателя, как и введение вещества сравнения аминугуанидина.

Таблица 4.1 – Влияние соединения АВ-19 и аминугуанидина на содержание глюкозы крови у крыс через 1, 2 и 3 мес. после развития экспериментального сахарного диабета ($M \pm m$, $n=15$)

Группа	1 мес.	2 мес.	3 мес.
Контрольная группа № 1 (интактные)	$5,55 \pm 0,15$	$5,02 \pm 0,28$	$3,90 \pm 0,08$
Контрольная группа № 2 (сахарный диабет)	$24,35 \pm 1,33^*$	$23,15 \pm 2,10^*$	$18,15 \pm 0,53^*$
Опытная группа № 1 (сахарный диабет + АВ-19 в дозе 20 мг/кг)	$27,25 \pm 1,98^*$	$19,36 \pm 2,22^*$	$18,77 \pm 0,84$
Опытная группа № 2 (сахарный диабет + аминугуанидин в дозе 50 мг/кг)	$22,26 \pm 2,66^*$	$19,13 \pm 1,57^*$	$18,24 \pm 0,79^*$

Примечания:

$M \pm m$ – среднее арифметическое значение и стандартная ошибка среднего арифметического.

* – $p < 0,05$, по сравнению с результатами, полученными у животных из группы интактного контроля (t-критерий Стьюдента и непараметрический критерий Манна-Уитни [Mann-Whitney, U-test] с поправкой Бонферрони).

Таблица 4.2 – Влияние соединения АВ-19 и аминугуанидина на содержание гликированного гемоглобина у крыс через 3 мес. после развития экспериментального сахарного диабета ($M \pm m$, $n=15$)

Группа	HbA1c, %
Интактный контроль	$6,35 \pm 0,32$
СД контроль	$15,11 \pm 0,93^*$
СД + АВ-19 в дозе 20 мг/кг	$12,56 \pm 1,25^*$
СД + аминугуанидин в дозе 50 мг/кг	$12,92 \pm 1,47^*$

Примечания:

HbA1c – гликированный гемоглобин;

$M \pm m$ – среднее арифметическое значение и стандартная ошибка среднего арифметического;

* – $p < 0,05$, по сравнению с результатами, полученными у лабораторных животных из группы интактного контроля (t-критерий Стьюдента и непараметрический U-критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

4.2. Влияние соединения АВ-19 и аминоксантидина на структурные и функциональные изменения глаз при экспериментальном стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете

4.2.1. Влияние соединения АВ-19 и аминоксантидина на прозрачность хрусталиков животных с сахарным диабетом

В результате проведенной биомикроскопии было установлено, что у интактных животных (контрольная группа № 1) хрусталики оставались прозрачными до конца эксперимента (0 баллов по классификации) (Таблица 4.3, Рисунок 4.1).

Таблица 4.3 – Влияние соединения АВ-19 и аминоксантидина на развитие помутнения в хрусталиках при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете ($M \pm m$, $n=15$)

Группы	Степень помутнения хрусталиков, баллы
Контрольная группа № 1 (интактные)	0
Контрольная группа № 2 (сахарный диабет)	$2,3 \pm 0,25^{\#}$
Опытная группа № 1 (сахарный диабет + АВ-19 в дозе 20 мг/кг)	$0,7 \pm 0,42^*$
Опытная группа № 2 (сахарный диабет + аминоксантидин в дозе 50 мг/кг)	$0,6 \pm 0,32^*$

Примечания:

$\#$ – показатели статистически значимо отличаются от контрольной группы № 1 (интактные) при $p < 0,05$; U-критерий Манна-Уитни.

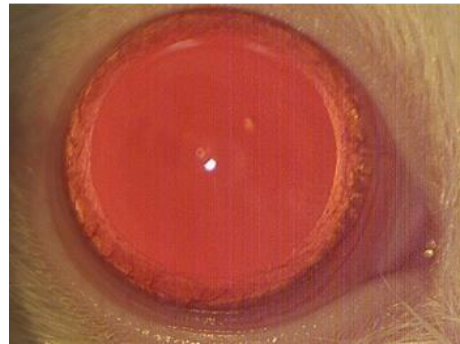
$*$ – показатели статистически значимо отличаются от контрольной группы № 2 (сахарный диабет) при $p < 0,05$; U-критерий Манна-Уитни.

В группе СД (контрольная группа № 2) у крыс запущенный катарактогенез приводил к развитию помутнений в $2,3 \pm 0,25$ балла (показатели статистически значимо отличаются от контрольной группы № 1 при $p < 0,05$; критерий Манна-Уитни). У крыс, получавших соединение АВ-19 (опытная группа № 1) и аминоксантидин (опытная группа № 2), результаты были достоверно лучше, так как развивались помутнения хрусталиков в $0,6 \pm 0,32$ баллов ($M \pm \sigma$) и $0,7 \pm 0,42$ баллов

($M \pm \sigma$) соответственно (показатели статистически значимо отличаются от группы контроля сахарного диабета при $p < 0,05$; U-критерий Манна-Уитни).



0 баллов – прозрачный хрусталик



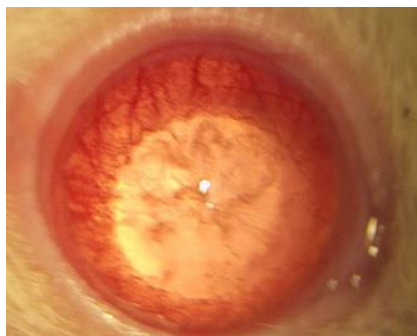
1 балл – минимальное помутнение
в центре хрусталика



2 балла – неоднородное помутнение
в центре и периферии хрусталика



3 балла – однородное помутнение
по всему хрусталику



4 балла – зрелая катаракта

Рисунок 4.1 – Биомикроскопическая картина хрусталиков на различной стадии формирования катаракты согласно модифицированной классификации Suryanarayana и др. (2005)

Таким образом, по данным рутинной биомикроскопии оба антигликирующих соединения достоверно тормозили развитие катаракты у крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом *in vivo*, однако у соединения АВ-19 антикатарактальный эффект был более выражен, чем у препарата сравнения.

4.2.2. Влияние соединения АВ-19 и аминугуанидина на патоморфологическую картину хрусталиков

По данным патоморфологического исследования у интактных животных (контрольная группа № 1) за 3 месяца эксперимента не появлялись признаки развития катаракты, а при развитии СД запускался активный катарактогенез (Рисунок 4.2).

У всех крыс из контрольной группы № 2 (СД) была выявлена степень помутнения хрусталиков, оцениваемая в $2,0 \pm 0,7$ балла ($M \pm m$) (различия статистически значимо отличаются относительно показателей контрольной группы № 1 при $p < 0,05$; t-критерий Стьюдента), с вовлечением в патологический процесс передней части хрусталика в виде дефрагментации и набухания волокон по периферии хрусталика, миграции переднего эпителия к полюсам и на заднюю поверхность хрусталика, образования морганиевых телец. В хрусталиках у животных, которым вводился аминугуанидин (опытная группа № 2), преобладали начальные признаки субкапсулярной или кортикальной катаракты с вакуолизацией и набуханием волокон хрусталика, в единичных случаях - с дефрагментацией и набуханием волокон по периферии хрусталика, миграцией переднего эпителия к полюсам хрусталика (степень помутнения хрусталиков в $1,4 \pm 0,5$ балла). У животных, получавших соединение АВ-19 (опытная группа № 1), обнаруживали морфологические признаки начальной катаракты, оцениваемой в $1,75 \pm 0,3$ баллов: умеренное набухание, вакуолизация и частичная дефрагментация волокон хрусталика преимущественно в передней части хрусталика; случаев тотальной деструкции хрусталика не выявлено.

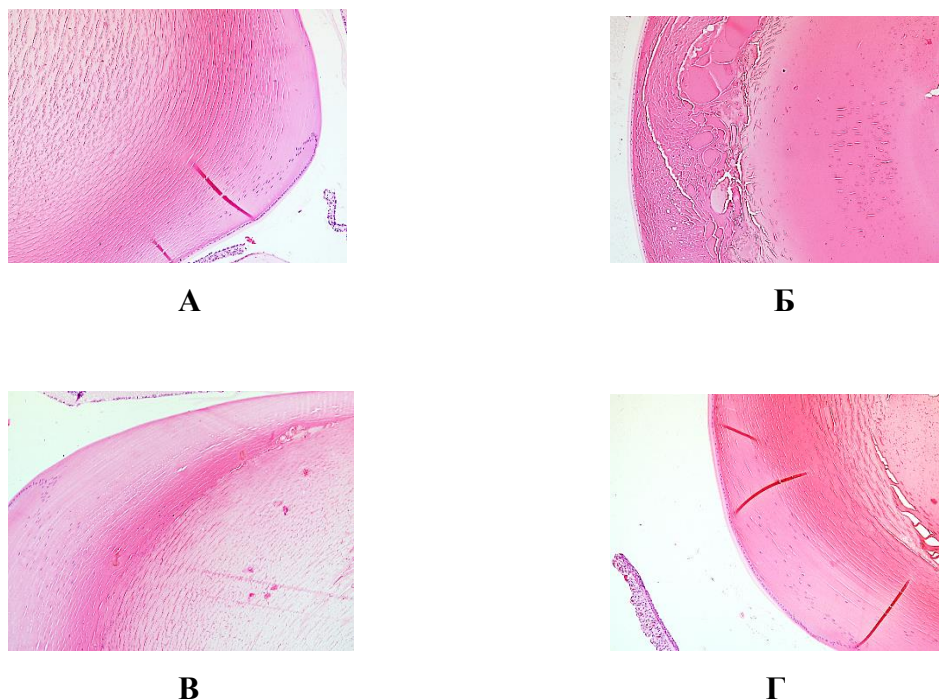


Рисунок 4.2 – Гистологическое строение хрусталиков лабораторных животных:
 А) Хрусталик intactной крысы. Нормальное гистологическое строение.
 Б) Хрусталик крысы с стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом. Выраженный отек, вакуолизация и дезорганизация волокон по всей окружности хрусталика. Удержание ядер хрусталиковыми волокнами, формирование балонных клеток и морганиевых телец. Отек волокон в ядерной части хрусталика. Гистологическая картина полной катаракты.
 В) Хрусталик крысы со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом, которой вводился амингуанидин в дозе 50мг/кг 3мес. Умеренный отек и вакуолизация волокон в передней и экваториальных зонах коркового слоя хрусталика. Миграция отдельных ядер волокон в герминативной зоне вглубь хрусталика. Гистологическая картина слабовыраженной кортикальной катаракты.
 Г) Хрусталик крысы со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом, которой вводилось соединение АВ-19 в дозе 20мг/кг 3мес. Нормальное строение хрусталиковых волокон.

Окраска гематоксилином-эозином-флоксином

Увеличение $\times 100$.

Результаты патоморфологического исследования хрусталиков экспериментальных животных согласуются с данными, полученными с помощью биомикроскопии: у крыс с тяжелым стрептозотоцин-индуцированным диабетом запускается активный катарактогенез, который приводит к формированию значительных помутнений вещества хрусталика уже к 3 мес. от начала заболевания; аминоксантидин и соединение АВ-19 проявляют ингибирующее действие на развитие диабетической катаракты, однако биомикроскопическая картина более показательна для демонстрации антикатарактального эффекта изучаемых соединений.

4.2.3. Влияние соединения АВ-19 и аминоксантидина на внутриглазное давление

В проведенном исследовании было выявлено, что у крыс с сахарным диабетом (контрольная группа № 2) статистически значимо повышалось внутриглазное давление (ВГД), по сравнению с интактными животными на 37 %.

Уровень ВГД у лабораторных животных, получавших соединение АВ-19 (опытная группа № 2), достоверно снижался на 30,1 %, по сравнению с животными с сахарным диабетом (Таблица 4.4). У лабораторных животных, получавших аминоксантидин, уровень ВГД не изменялся, по сравнению с крысами из группы контроля сахарного диабета. Таким образом, по результатам контрольного исследования уровня ВГД у крыс с сахарным диабетом достоверно развивалась офтальмогипертензия через 3 мес. после введения стрептозотоцина. Аминоксантидин не оказывал влияния на уровень ВГД у диабетических животных, соединение АВ-19 при тех же условиях эксперимента проявило офтальмогипотензивный эффект при системном введении. Данная особенность нового производного пиразолотриазина, возможно, связана с его более выраженной антигликирующей активностью, чем у препарата сравнения, и требует дальнейшего изучения.

Таблица 4.4 – Влияние соединения АВ-19 и аминугуанидина на уровень внутриглазного давления (ВГД) при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете ($M \pm m$, $n=15$)

Группы	ВГД, мм рт.ст.
Контрольная группа № 1 (интактные)	$11,6 \pm 0,87$
Контрольная группа № 2 (сахарный диабет)	$15,9 \pm 0,85^*$
Опытная группа № 1 (сахарный диабет + АВ-19 в дозе 20 мг/кг)	$11,1 \pm 0,94^\#$
Опытная группа № 2 (сахарный диабет + аминугуанидин в дозе 50 мг/кг)	$13,8 \pm 1,19$

Примечание:

* - показатели статистически значимо отличаются от контрольной группы № 1 при $p < 0,05$; t-критерий Стьюдента.

[#] - показатели статистически значимо отличаются от контрольной группы № 2 при $p < 0,05$; t-критерий Стьюдента.

4.2.4. Влияние соединения АВ-19 и аминугуанидина на уровень конечных продуктов гликирования и карбоксиметиллизина в хрусталиках

По результатам иммуноферментного анализа в группе СД (контрольная группа № 2) отмечалось 2х-кратное увеличение содержания конечных продуктов гликирования (КПГ) в хрусталиках крыс, по сравнению с этими показателями у интактных животных (контрольная группа № 1).

В группах животных, получавших антигликирующие соединения (опытные группы № 1 и № 2), наблюдалась противоположная тенденция: содержание КПГ в хрусталиках крыс, получавших соединение АВ-19 снижалось на 47 %, а у животных, получавших аминугуанидин, на 40 %.

У животных с сахарным диабетом (контрольная группа № 2) отмечалось повышение содержания карбоксиметиллизина (КМЛ) в хрусталиках на 33 %. При этом на фоне введения антигликирующих соединений у крыс отмечалось статистически значимое снижение данного показателя (Таблица 4.5), более

выраженное в группе животных, получавших соединения АВ-19 (на 47,6 %) (опытная группа № 1).

При развитии тяжелой гипергликемии у крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом закономерно повысилось общее содержание КПП и одного из основного из них – КМЛ в хрусталиках (которые характеризуются высоким содержанием длительно живущих белков), так как при сахарном диабете объективно повышается интенсивность реакции Майяра и образование КПП [389, 392, 395-396]. Оба изучаемых соединения статистически значимо уменьшали образование КПП и КМЛ в хрусталиках у экспериментальных животных. В то же время соединение АВ-19, проявляющее в 14 раз более выраженную антигликирующую активность *in vitro*, чем аминугуанидин, *in vivo* также эффективнее ингибировало образование КПП и КМЛ в условиях экспериментального сахарного диабета.

Таблица 4.5 – Влияние соединения АВ-19 и аминугуанидина на содержание конечных продуктов гликирования (КПП) и карбоксиметиллизина (КМЛ) в хрусталиках животных при стрептозотоцин-индуцированном сахарным диабетом, (M±m, n=15)

Группы	КПП, мкг/мг белка	КМЛ, мкг/мг белка,
Контрольная группа № 1 (интактные)	280,32±43,4	1,92±0,11
Контрольная группа № 2 (контроль сахарный диабет)	546,22±20,23 [#]	2,56±0,20 [#]
Опытная группа № 1 (сахарный диабет + АВ-19 в дозе 20 мг/кг)	284,42±31,84*	1,34±0,12*
Опытная группа № 2 (сахарный диабет + аминугуанидин в дозе 50 мг/кг)	333,32±60,99*	1,76±0,27*

Примечание:

[#] - значения статистически значимо отличаются от показателей контрольной группы № 1 при $p < 0,05$; t-критерий Стьюдента;

* – значения статистически значимо отличаются от показателей контрольной группы № 2 при $p < 0,05$; t-критерий Стьюдента.

4.2.5. Влияние соединения АВ-19 и амингуанидина на глазную микроциркуляцию

При развитии сахарного диабета у крыс (опытная группа № 2) уровень гемомикроперфузии снижался на 40,5 %, по сравнению с интактными животными контрольной группы № 1 (Таблица 4.6).

В группе животных, получающих соединение АВ-19, уровень глазной микроциркуляции достоверно повышался на 26,9 %, по сравнению с группой животных с сахарным диабетом (опытная группа № 2). У животных, получавших амингуанидин, уровень микроциркуляции увеличивался на 20,4 %, по сравнению с группой животных из опытной группы № 2, и достоверно не отличается от нее.

Таблица 4.6 – Влияние соединения АВ-19 и амингуанидина на уровень глазной микроциркуляции при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете ($M \pm m$; $n=15$)

Экспериментальные группы	Уровень микроциркуляции, п.е.
Контрольная группа № 1 (интактные)	2478,0 $\pm$ 154,9
Контрольная группа № 2 (сахарный диабет)	1473,4 $\pm$ 141,6 [#]
Опытная группа № 1 (сахарный диабет + АВ-19 в дозе 20 мг/кг)	1870,0 $\pm$ 72,9 [*]
Опытная группа № 2 (сахарный диабет + амингуанидин в дозе 50 мг/кг)	1774,4 $\pm$ 136,8

Примечание:

[#] - значения статистически значимо отличаются от показателей контрольной группы № 1 при $p < 0,05$; t-критерий Стьюдента;

^{*} – значения статистически значимо отличаются от показателей контрольной группы № 2 при $p < 0,05$; t-критерий Стьюдента.

Ишемическое повреждение глаза при некомпенсированной гипергликемии в данном эксперименте выразилось в достоверном снижении уровня микроциркуляции в бассейне задних длинных цилиарных и передних цилиарных артерий у крыс с экспериментальным сахарным диабетом. Оба исследуемых

соединения способствовали минимизации нарушений глазной гемоперфузии, в том числе и в периферических отделах сетчатки, таким образом, проявляя непрямой ретинопротекторный эффект.

4.2.6. Влияние соединения АВ-19 и амингуанидина на электрофизиологические параметры сетчатки

В проведенном исследовании выявлено, что стрептозотоцин-индуцированный сахарный диабет (контрольная группа № 2) у животных приводит к снижению биоэлектрической активности сетчатки (Таблица 4.7). Так, коэффициент b/a достоверно снижался на 52,5 %, по сравнению со средним значением у интактных животных (контрольная группа № 1), это в свою очередь подтверждает литературные данные, что наиболее ранним признаком снижения зрительных функций при СД является снижение амплитуд волн биопотенциалов [32, 223, 353, 358].

Таблица 4.7 – Влияние соединения АВ-19 и амингуанидина на значения коэффициента b/a при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете ($M \pm m$; $n=15$)

Экспериментальные группы	Индекс b/a , отн. ед.
Контрольная группа № 1 (интактные)	$0,57 \pm 0,01$
Контрольная группа № 2 (сахарный диабет)	$0,27 \pm 0,05^{\#}$
Опытная Группа № 1 (сахарный диабет + АВ-19 (в дозе 20 мг/кг))	$0,56 \pm 0,01^*$
Опытная Группа № 2 (сахарный диабет + амингуанидин в дозе 50 мг/кг)	$0,47 \pm 0,21$

Примечание:

$\#$ - значения статистически значимо отличаются от показателей контрольной группы № 1 при $p < 0,05$; t-критерий Стьюдента;

$*$ – значения статистически значимо отличаются от показателей контрольной группы № 2 при $p < 0,05$; t-критерий Стьюдента.

На фоне коррекции стрептозотоцин-индуцированного диабета соединением АВ-19 выявилось достоверное повышение коэффициента b/a на 100 %, по сравнению с группой животных с СД (контрольная группа № 2) ($p < 0.05$). Для животных, получавших аминогуанидин, наблюдалась тенденция к увеличению электрофизиологического ответа, по сравнению с группой животных со стрептозотоцин-индуцированным диабетом (контрольная группа № 2).

Таким образом, оба соединения, обладающие антигликирующей активностью, способствовали сохранению биоэлектрической активности сетчатки, которая достоверно подвергалась депрессии у крыс из контрольной группы сахарного диабета. Однако нейроретинопротекторный эффект соединения АВ-19 был более выражен, чем у препарата сравнения, так как амплитуда электроретинограммы у крыс, получавших производное пиразолотриазина фактически соответствовала данному параметру у интактных животных.

4.2.7. Влияние соединения АВ-19 и аминогуанидина на плотность ганглиозного слоя сетчатки

В результате проведенного гистологического исследования сетчатки было выявлено, что у интактных крыс из контрольной группы № 1 линейная клеточная плотность ядер (ЛКП) слоя ганглиозных клеток сетчатки составила 9,0 (8,0–10,0) ядер/100 мкм (Таблица 4.8).

У крыс с экспериментальным сахарным диабетом (СД) (контрольная группа № 2) ЛКП ганглиозного слоя сетчатки снизилась на 22,2 % ($p = 0,0019$), по сравнению с интактными животными и составила 7,0 (6,0–8,0) ядер/100 мкм.

У крыс, получавших соединение АВ-19 (опытная группа № 1), ЛКП ганглиозного слоя сетчатки соответствовала значениям данного параметра у крыс в контрольной группе № 1 и составила 9,0 (8,0–11,0) ядер/100 мкм ($p = 0,56$), и возрастала на 28,6 % ($p < 0,001$), по сравнению диабетическими животными в контрольной группе № 2.

Таблица 4.8 – Линейная клеточная плотность ганглиозного слоя сетчатки крыс при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете и его фармакологической коррекции, Ме (Q1-Q3)

Параметр	Контрольная группа № 1 (интактные)	Контрольная группа № 2 (сахарный диабет)	Опытная группа № 1 (сахарный диабет+АВ-19 в дозе 50мг/кг)	Опытная группа № 2 (сахарный диабет+аминогуанидин в дозе 50 мг/кг)
Линейная клеточная плотность, ядер/100 мкм	9,0 (8,0-10,0)	7,0 (6,0-8,0) *	9,0 (8,0-11,0)#	7,0 (6,0-7,0)*
%, по сравнению с контрольной группой № 1		-22,2 %	0 %	-22,2 %
%, по сравнению с контрольной группой № 2			+28,6 %	0 %

Примечания:

* - различия достоверны, по сравнению с контрольной группой № 1 при $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни;

- различия достоверны, по сравнению контрольной группой № 2 с СД при $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни;

У крыс, получавших аминогуанидин, ЛКП ганглиозного слоя сетчатки снижалась на 22,2 % ($p=0,0016$), по сравнению с интактными животными и составила 7,0 (6,0-7,0) ядер/100 мкм и соответствовала значениям данного параметра в группе крыс в контрольной группе № 2 ($p=3,5872$).

В результате соединение АВ-19 снижало выраженность нейродегенеративного процесса в сетчатке при некомпенсированном сахарном диабете, способствуя сохранению клеточной популяции нейронов третьего порядка, что, вероятно, относится и к остальным структурным компонентам сетчатки. Таким образом, активное антигликирующее соединение АВ-19 снижало степень проявления патологических процессов в сетчатке при диабетической ретинопатии как на функциональном, так и на морфологическом уровнях.

4.3. Заключение

Новое производное пиразоло[5,1-С]-1,2,4-триазина – соединение АВ-19 – проявляло выраженное антикатарактальное действие на хрусталики лабораторных животных со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом. На фоне применения соединения АВ-19 происходило торможение катарактогенеза как по данным офтальмоскопии, так и по результатам патоморфологического исследования. При этом по данным иммуноферментного анализа содержание КПП и КМЛ в хрусталиках лабораторных животных, получавших соединение АВ-19, было ниже, чем у крыс, которые получали амингуанидин, и приближалось к показателям группы интактного контроля. Кроме того, соединение АВ-19 способствовало увеличению уровня глазной микроциркуляции и нормализации электрофизиологического состояния сетчатки у животных со стрептозотоцин-индуцированным диабетом. Также соединение АВ-19 влияло на уровень офтальмогипертензии у животных с экспериментальным сахарным диабетом, что, вероятно, было связано с торможением дегенеративных процессов в глазу и, в частности, в трабекулярной сети.

Степень развития катаракты находится в прямой зависимости от содержания в хрусталиках КПП (и одного из основных – КМЛ). Высокая гипергликемия может приводить к ишемическим повреждениям сетчатки. Применение антигликирующего соединения способно затормозить развитие диабетической катаракты и изменения сетчатки. Соответственно, производное пиразоло-1,2,4-триазина – соединение АВ-19 – обладает потенциальной антикатарактальной, нейроретинопротекторной и офтальмогипотензивной активностью и является перспективным корректором глазных осложнений сахарного диабета, связанных с процессом неферментативного гликирования.

ГЛАВА 5. ГЕМОРЕОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЯ АВ-19 И АМИНОГУАНИДИНА

Пути развития микрососудистых осложнений сахарного диабета (в том числе и диабетической ретинопатии) в значимой степени обусловлены непосредственными последствиями хронической гипергликемии, а именно эндотелиальной дисфункцией, повышенной сосудистой проницаемостью и аномальной микрогемореологией, приводящими к тканевой гипоксии и ишемии [20]. Первые два патологических процесса подробно описаны в Главе 1. Изменения, происходящие с реологическими параметрами крови при сахарном диабете, прежде всего, затрагивают эритроциты, которые составляют до 98 % от общего объема форменных элементов крови [21]. К этим изменениям относятся гиперагрегация эритроцитов, нарушение их формы (увеличение количества переходных, предгемолитических и дегенеративных форм) и сниженная способность к деформации [20]. Способность эритроцитов к деформации зависит от уровня глюкозы крови. При повышении гликемии деформируемость снижается, что было продемонстрировано в ряде актуальных публикаций [198, 85, 87]. Гликирование мембранных и внутриклеточных белков снижает деформируемость и вязкоэластические свойства эритроцита при сахарном диабете [20].

Имеется корреляционная связь между тяжестью осложнений сахарного диабета, длительностью основного заболевания и степенью нарушений деформируемости эритроцитов [21, 33]. В тоже время существуют данные о том, что у пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией (ДР) деформируемость снижается значительно, чем у больных с непролиферативной формой ДР [87].

Деформируемость эритроцитов обусловлена такими факторами, как внутренняя вязкость (концентрация внутриклеточного гемоглобина (Hb)), клеточная геометрия (отношение поверхности к объему), эластические и вязкостные свойства мембраны, которые в определенной степени связаны с наличием в ней Hb, особенно его гликированной формы (HbA1c) [33]. In vivo при

инкубации эритроцитов в различных концентрациях раствора глюкозы деформируемость эритроцитов ухудшается [85]. HbA1c составляет 4–6 % общего количества Hb в крови здоровых людей, тогда как у больных СД уровень HbA1c в 2–3 раза выше [21]. При стабильной гипергликемии все больше промежуточных лабильных соединения глюкозы с HbA превращаются в стабильные кетоновые формы, которые существуют вплоть до того момента, когда эритроциты подвергаются эритродиерезу. Снижение деформируемости мембраны эритроцита связано с увеличением связывания гликированного гемоглобина с ее внутренней поверхностью [20]. В клинической медицине фактически постулировано, что высокие показатели HbA1c являются маркером декомпенсации и возможного развития поздних осложнений сахарного диабета [198].

Инкубирование эритроцитов в среде с высоким содержанием глюкозы дозозависимым путем приводит к повышению ацетилирование тубулина и его транслокации в эритроцитарную мембрану [85]. Повышение мембраносвязанной фракции тубулина, как полагают авторы эксперимента, снижает способность эритроцитов к деформации. При гипергликемии снижается активность Na/K-АТФазы и насосной функции Ca-АТФазы, что приводит к внутриклеточному накоплению ионов Ca^{+} и повышенному сшиванию мембранных белков [87], а также снижается внутриклеточное содержание восстановленного глутатиона [20]. Окислительный стресс приводит к повреждению белков и фосфолипидов эритроцитарных мембран [20]. Повышение соотношения холестерин/фосфолипиды мембран красных клеток крови у больных сахарным диабетом дополнительно ведет к снижению их способности к деформации [21].

Вызванное сниженной деформируемостью эритроцитов затруднение капиллярной гемоперфузии и транспортной функции эритроцитов, изменение давления в сосудах микроциркуляторного русла, стимулирование утолщения их базальной мембраны приводят к снижению показателей диффузной доставки кислорода к тканям [14]. Соответственно, эритроциты со сниженной способностью к деформации при сахарном диабете играют триггерную роль в развитии микроангиопатий. Таким образом, показатель деформируемости эритроцитов

позволяет опосредованно судить о тяжести микрососудистых осложнений сахарного диабета, в том числе ретинопатии [87]. В данном исследовании проводилось изучение влияния соединения АВ-19 на параметры деформируемости эритроцитов у крыс с осложнениями при экспериментальном сахарном диабете *in vivo* и эритроцитов, обработанных глиоксалем *in vitro*.

5.1. Влияние соединения АВ-19 и аминогуанидина на деформируемость эритроцитов

Известно, что глюкоза способна вступать в неферментативное взаимодействие со свободными аминогруппами белков (реакция Майяра) и приводить к образованию КПП. Интенсивность гликирования увеличивается при СД. Кроме того, в условиях гипергликемии происходит развитие карбонильного стресса, при котором формируются реактивные дикарбонильные интермедиаты, например, метилглиоксаль, которые, как и глюкоза, участвуют в образовании КПП. Кроме того, СД протекает на фоне синдрома повышенной вязкости крови, который тесно связан с повышением внутренней вязкости эритроцитов (нарушением механических свойств эритроцитарной мембраны) и относительным эритроцитозом, в связи с этим оказалось целесообразным изучение влияния соединения АВ-19 и аминогуанидина на деформируемость эритроцитов в условиях экспериментального СД *in vivo* и при инкубации эритроцитов с глиоксалем *in vitro*.

5.1.1. Действие соединения АВ-19 и аминогуанидина на деформируемость эритроцитов крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом

В результате проведенного исследования было выявлено, что у крыс на фоне экспериментального СД развивалось нарушение структурно-функциональных свойств мембран эритроцитов, на что указывало снижение деформируемости этих клеток (Таблица 5.1.). При этом индекс удлинения эритроцитов у крыс с СД из

группы контроля статистически значимо ($p < 0,05$) снижался на 18 %, по сравнению с результатами, полученными у животных из интактной группы. Введение соединения АВ-19 в дозе 20 мг/кг статистически значимо ($p < 0,05$) увеличивало степень деформируемости эритроцитов на 8 %, по сравнению с результатами, полученными у крыс с СД из группы контроля, в то же время величина аналогичного эффекта амингуанидина составила 11 %.

Таблица 5.1 – Влияние соединения АВ-19 и амингуанидина на деформируемость эритроцитов крыс со стрептозотоцин-индуцированным СД ($M \pm m$, $n=15$)

Группа	ИУЭ, у.е.
Контрольная группа № 1 (интактные)	$0,33 \pm 0,01$
Контрольная группа № 2 (сахарный диабет)	$0,27 \pm 0,01^*$
Опытная группа № 1 (сахарный диабет+ АВ-19 в дозе 20 мг/кг)	$0,29 \pm 0,02^*$
Опытная группа № 2 (сахарный диабет + амингуанидин в дозе 50 мг/кг)	$0,30 \pm 0,04$

Примечания:

ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов;

у.е. – условные единицы;

$M \pm m$ – среднее арифметическое значение и стандартная ошибка среднего арифметического;

* – $p < 0,05$ по сравнению с результатами, полученными у животных из группы интактного контроля (непараметрический критерий Манна-Уитни [Mann-Whitney, U-test]).

- – $p < 0,05$ по сравнению с результатами, полученными у животных из группы контроля СД (U-критерий Манна-Уитни).

5.1.2. Влияние соединения АВ-19 и амингуанидина на деформируемость эритроцитов, обработанных глиоксалем

В результате проведенного исследования было обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) снижение деформируемости эритроцитов кроликов под влиянием глиоксаля в концентрации 1 мМ (Таблица 5.2., Рисунок 5.1). Это подтверждалось снижением индекса удлинения эритроцитов в 2,5 раза.

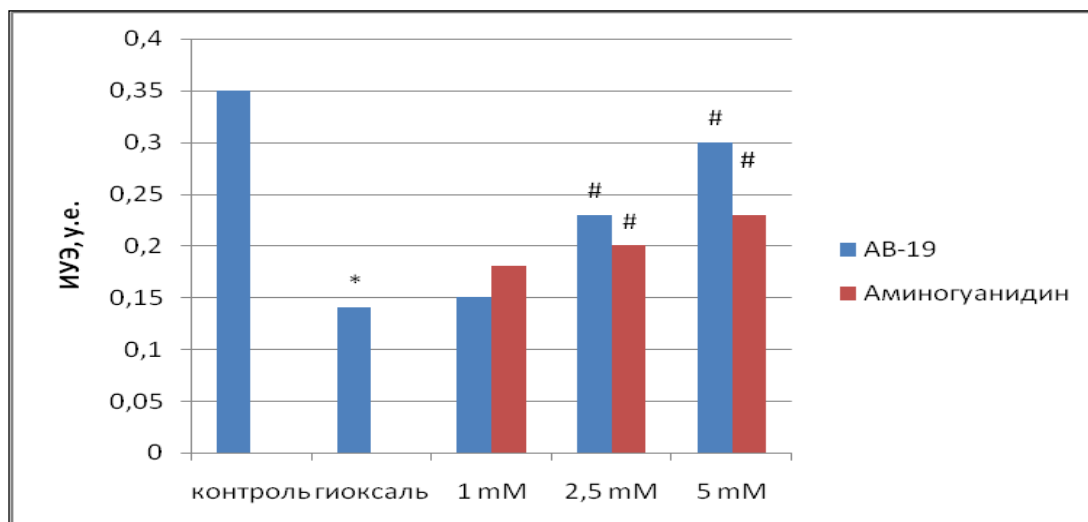


Рисунок 5.1 – Влияние соединения АВ-19 и аминогуанидина в концентрациях 1, 2,5 или 5 мМ на деформируемость эритроцитов, обработанных глиоксалем *in vitro*

Примечания:

ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов.

у.е. – условные единицы.

* – $p < 0,05$, по сравнению с результатами, полученными в контроле (критерий Манна-Уитни).

– $p < 0,05$, по сравнению с результатами, полученными в контроле с глиоксалем (U-критерий Манна-Уитни).

Соединение АВ-19 способствовало увеличению деформируемости эритроцитов. После 10-минутной инкубации с соединением АВ-19 в концентрации 1 мМ индекс удлинения эритроцитов увеличивался на 7 %, в концентрации 2,5 мМ – на 64 % ($p < 0.05$), а в концентрации 5 мМ – практически в два раза ($p < 0.05$). Следует отметить, что увеличение деформируемости эритроцитов под действием соединения АВ-19 зависело от его дозы, и в концентрации 5 мМ по своей активности соединение АВ-19 существенно превосходило препарат сравнения аминогуанидин. На основании полученных данных для соединения АВ-19 была рассчитана IC_{50} , которая составила 2,1 мМ.

Таким образом, инкубация с соединением АВ-19 снижала жесткость мембран эритроцитов, обработанных глиоксалем, и улучшало их текучесть *in vitro*.

Таблица 5.2 – Влияние соединения АВ-19 и амингуанидина на деформируемость эритроцитов, обработанных глиоксалем *in vitro* ($M \pm m$)

Тестируемый образец	Концентрация, мМ	ИУЭ, у.е.
Контроль (интактный)	–	$0,35 \pm 0,01$
Контроль (глиоксаль)	–	$0,14 \pm 0,02^*$
АВ-19	1	$0,15 \pm 0,02$
	2.5	$0,23 \pm 0,02^*$
	5	$0,30 \pm 0,02^*$
Амингуанидин	1	$0,18 \pm 0,03$
	2.5	$0,20 \pm 0,02^*$
	5	$0,23 \pm 0,01^*$

Примечания:

ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов.

$M \pm m$ – среднее арифметическое значение и стандартная ошибка среднего арифметического.

* – $p < 0,05$, по сравнению с результатами, полученными в контроле (U-критерий Манна-Уитни).

- – $p < 0,05$, по сравнению с результатами, полученными в контроле с глиоксалем (U-критерий Манна-Уитни).

5.2. Заключение

У крыс с экспериментальным сахарным диабетом развивались гемореологические нарушения в виде изменений структурно-функциональных свойств мембран эритроцитов и снижения их деформируемости. При этом курсовое введение соединения АВ-19 в дозе 20 мг/кг статистически значимо ($p < 0,05$) увеличивало способность эритроцитов к деформации, по сравнению с результатами, полученными у крыс с СД из контрольной группы.

Результаты изучения влияния соединения АВ-19 на деформируемость эритроцитов кроликов *in vitro*, подтверждают его способность снижать жесткость мембран эритроцитов, обработанных глиоксалем, и улучшать их деформируемость.

Таким образом, соединение АВ-19 способно улучшать реологические параметры крови, как *in vivo* при развитии сахарного диабета, так и при

лабораторном моделировании реакции неферментативного гликирования *in vitro*. Данный гемореологический эффект производного пиразолотриазина, вероятно, связан с его высокой антигликирующей активностью по отношению к белкам эритроцитарной мембраны.

ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕСТНОРАЗДРАЖАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ АВ-19 ПРИ ОДНОКРАТНОМ НАНЕСЕНИИ НА КОНЬЮНКТИВУ ГЛАЗА МОРСКИХ СВИНОК

Ведущим способом введения лекарственных средств в офтальмологии является местное применение глазных капель, суспензий, гелей и мазей в виде инстилляций или нанесения в конъюнктивальную полость, что особенно актуально для лечения хронических глазных заболеваний, требующих длительной ежедневной или курсовой терапии [43]. К таким заболеваниям относятся и глазные осложнения сахарного диабета (катаракта, глаукома, ретинопатия). В силу анатомо-физиологических факторов (рефлекторное слезотечение, которое приводит к «разбавлению» активного компонента лекарственного средства, рефлекторное моргание, каждое из которых эвакуирует из конъюнктивальной полости 2 мкл жидкости по слезоотводящим путям) местный способ введения лекарственных препаратов в конъюнктивальную полость имеет низкую биодоступность (1-10 %) [43]. Именно поэтому достижение терапевтической концентрации активного компонента в тканях и камерах глаза во многом зависит от отсутствия или минимизации местнораздражающих свойств лекарственного препарата. Таким образом, для потенциального лекарственного средства, применяемого в офтальмологии для лечения отдаленных последствий сахарного диабета, важно еще на этапе доклинических исследований выявить степень местнораздражающего действия активного вещества на конъюнктиву и роговицу глаза.

6.1. Результаты исследования местнораздражающего действия соединения АВ-19 при однократном нанесении на конъюнктиву глаза морских свинок

При однократном нанесении 0,2 % или 2,0 % суспензий соединения АВ-19 на конъюнктиву глаза морских свинок не выявлено раздражающего действия.

По результатам исследования ни в одной из групп не наблюдалось животных с положительной реакцией (Таблица 6.1.).

Таблица 6.1 – Оценка местнораздражающего действия соединения АВ-19 на конъюнктиву глаза морских свинок при однократной аппликации (n=5)

Группы животных	АВ-19, концентрация.	Пол животных	Количество животных с положительной реакцией, 15 мин	Количество животных с положительной реакцией, 24 ч	Количество животных с положительной реакцией, 48 ч
Исследуемые группы 1, 2	0,2 % суспензия	Самцы	0/5	0/5	0/5
		Самки	0/5	0/5	0/5
Исследуемые группы 3, 4	2 % суспензия	Самцы	0/5	0/5	0/5
		Самки	0/5	0/5	0/5
Контрольные группы 1, 2	Дистил. вода	Самцы	0/5	0/5	0/5
		Самки	0/5	0/5	0/5

Примечания:

В числителе указано количество морских свинок с положительной реакцией, в знаменателе – количество животных в группе.

* – $p < 0,05$, по сравнению с результатами, полученными у животных, которые получали дистиллированную воду (критерий хи-квадрат).

6.2. Заключение

Исследование местнораздражающего действия соединения АВ-19 проводили *in vivo* в соответствии с целью и задачами исследования согласно требованиям, предъявляемым при проведении доклинических исследований лекарственных средств и Правил надлежащей лабораторной практики.

По результатам исследования местнораздражающего действия соединения АВ-19 при однократном нанесении на конъюнктиву глаза морских свинок не выявлено раздражающего эффекта со стороны конъюнктивы.

ГЛАВА 7. НЕЙРОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ АВ-19, ВЫЯВЛЕННЫЕ В МНОГОТЕСТОВОМ НАБЛЮДЕНИИ ПО S. IRWIN

Поскольку сахарный диабет является хроническим заболеванием, требующим длительного применения сахароснижающих препаратов, лекарственная безопасность является приоритетным направлением при создании новых препаратов. В ходе проведенных исследований была изучена специфическая фармакологическая активность соединения АВ-19 на структуры и функции глаз в условиях экспериментального моделирования поздних осложнений сахарного диабета. Полученные результаты доказывают достаточно высокую эффективность соединения АВ-19 и целесообразность дальнейшего углубленного изучения спектра его свойств и потенциальных нейротоксических эффектов. В связи с этим, особый интерес представляет изучение нейротоксикологических эффектов соединения АВ-19 с использованием многотестового наблюдения по S.Irwin.

7.1. Нейротоксический профиль соединения АВ-19 при введении различных доз изучаемого вещества в многотестовом наблюдении по S. Irwin

У животных, получавших соединение АВ–19 в средней эффективной дозе, не отмечалось достоверных изменений изучаемых показателей (Таблица 7.1). При исследовании соединения АВ-19 в дозе, превышающей среднюю эффективную в 5 раз, оцениваемые параметры, характеризующие нервно-мышечную возбудимость, функциональное состояние вегетативной нервной системы, соответствовали норме, установленной для данной тест-системы.

Таблица 7.1 – Влияние соединения АВ-19 в исследуемых дозах на нейротоксические симптомы у мышей по модифицированной методике S. Irwin (n=6)

Тестируемые параметры	АВ-19				
	20 мг/кг	100 мг/кг	200 мг/кг	400 мг/кг	1000 мг/кг
Поведенческие реакции					
Груминг	0	0(↓)	0(↓)	↓	↓
Спонтанная двигательная активность	0	0(↓)	0(↓)	↓	↓
Пассивность	0	0(↑)	↑	↑	↑
Нервно-мышечная возбудимость					
Общий тонус скелетных мышц	0	0	0	0(↓)	↓
Реакция на стук	0	0	0	0(↓)	↓
Вегетативные эффекты					
Частота дыхания	0	0	0	0(↓)	↓
Температура тела	0	0	0	0(↓)	↓
Влияния на рефлексы					
Слуховой рефлекс	0	0	0	0(↓)	↓

Примечания:

↓ – изменения, связанные с ослаблением тестируемого показателя;

↑ – изменения, связанные с усилением тестируемого показателя;

0 – отсутствие изменений тестируемого параметра.

Из регистрируемых показателей, которые иллюстрируют поведенческие реакции, через 1 час после введения вещества у животных фиксировалось статистически незначимое снижение груминга и спонтанной двигательной активности, наблюдалось пассивность в поведении. Остальные параметры, в сравнении с группой контроля, не изменились. После введения дозы, 10-тикратно превышающей среднюю эффективную дозу соединения АВ-19, наблюдались изменения спонтанной двигательной активности и груминга, достоверно увеличивался показатель пассивности. Были выявлены случаи снижения рефлекторных реакций на тактильное прикосновение и болевой раздражитель. В то же время со стороны вегетативных эффектов зафиксировано не было.

Для животных на 60 и 120 минутах после введения соединения АВ-19 в дозах 400 и 1000 мг/кг была выявлена характерная картина интоксикации: снижение показателя двигательной активности животных (пассивность, спонтанная двигательная активность - в дозе 1000 мг/кг), уряжение частоты актов груминга, по сравнению с исходным значением и показателями контрольной группы угнетались рефлекторные реакции (на звук и на прикосновение в дозе – 1000 мг/кг, а на боль – в обеих дозах), снижение мышечного тонуса конечностей, в особенности задних лап. Описанные симптомы дополнялись уряжением частоты дыхательных движений и гипотермией. Большинство регистрируемых эффектов соединения АВ-19 были дозозависимы: значительная часть эффектов в большинстве случаев развивалась к 1 часу наблюдения и в дозе 400 мг/кг статистически была не достоверна, а в дозе, превышающей эффективную в 50 раз, интоксикационные изменения усиливались и наблюдались в течение всего времени наблюдения.

В совокупности выявленные изменения указанных признаков в многопараметровом тестировании демонстрируют развитию седации с выраженной вегетотропной симптоматикой у лабораторных животных. Результаты данного исследования говорят об отсутствии значимого нейротоксического влияния соединения АВ-19 в средней эффективной дозе (20 мг/кг), и в дозе, превышающей эффективную в 5 раз. По большинству наблюдаемых параметров при увеличении дозы от 400 мг/кг и выше при введении АВ-19 у животных развивается выраженная седация, тахипноэ и гипотермия, и отмечается снижение скорости нервно-мышечной передачи.

7.2. Заключение

По данным исследования установлено, что для соединения АВ-19, вводимого в средней эффективной дозе и дозах, превосходящих среднюю эффективную в 5 и 10 раз, не характерно влияние на функциональное состояние вегетативной нервной системы и нервно-мышечного возбуждения. Среди спектра регистрируемых поведенческих эффектов наблюдается снижение активности лабораторных

животных. В то же время отдельные случаи снижения рефлекторных реакций на тактильное прикосновение и болевой раздражитель в дозе 200 мг/кг не имели достоверного различия с животными из группы интактного контроля. Доза 400 мг/кг условно может быть обозначена как начальная, которая провоцирует выраженные токсические реакции, и может быть рекомендована для углубленного исследования хронической токсичности соединения АВ-19. Отмеченные изменения нейрофункционального состояния у мышей позволяют предварительно определить минимальную токсическую дозу (ТД_{мин}) для АВ-19 при внутрижелудочном введении: $400 \text{ мг/кг} < \text{ТД}_{\text{мин}} \leq 1000 \text{ мг/кг}$, и описать клиническую картину вероятной передозировки соединением АВ-19. Таким образом, значимыми из регистрируемых эффектов являются: седация, снижение мышечного тонуса, а со стороны вегетативной нервной системы – тахипноэ и гипотермия. По итогам данного исследования можно сделать вывод о том, что для соединения АВ-19 характерно низкое токсическое действие в отношении поведения животных при многотестовом наблюдении по S.Irwin.

ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно данным литературы, неуклонно растет количество лиц с сахарным диабетом, а среди них – количество пациентов, имеющих глазную патологию, ассоциированную с основным заболеванием [138, 159, 180, 190, 195]. Развитие таких осложнений, как катаракта, ретинопатия и глаукома, опасны не только прогрессирующим снижением зрения, но и развитием слепоты. Современные подходы к их лечению весьма эффективны и непрерывно улучшаются, но в то же время они остаются радикальными, имеют ряд серьезных ограничений и осложнений, их успешность часто является временной, учитывая хронический характер сахарного диабета [59, 165, 330, 388, 406]. Профилактика осложнений сахарного диабета напрямую связана с контролем уровня гликемии, которая не всегда возможна, поэтому поиск новых средств фармакологической коррекции последствий сахарного диабета является актуальной задачей.

В качестве потенциальных средств для профилактики и лечения отдаленных последствий сахарного диабета рассматриваются антигликирующие соединения [10]. Ингибирование реакции Майяра при подробном рассмотрении патофизиохимических механизмов развития отдаленных последствий сахарного диабета выглядит обоснованным и перспективным. Активация оси КПП/рецептор КПП (pКПП) вызывает генерацию активных кислородных метаболитов (окислительный стресс), образование молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1) (лейкостаз, тромбообразование), провоспалительных цитокинов, хемокинов и проапоптотических белков (ИЛ-6, ИЛ-1 β , ФНО- α , Вах, iNOS) (апоптоз нейронов сетчатки, клеток Мюллера, клеток слоя пигментного эпителия сетчатки, перицитов, эндотелиальных клеток сосудов сетчатки, эпителиальных клеток хрусталика), эндотелиального фактора роста (неоангиогенез), активация протеинкиназы C (уменьшение белков плотных контактов эндотелиальных клеток сетчатки ZO-1, ZO-2 – патологическая проницаемость гематоофтальмического барьера, а уменьшение коннексонов в хрусталике – катарактогенез) [70, 72, 73, 209, 274, 377, 417, 424]. Гликирование мембран эритроцитов и гемоглобина приводит к

снижению их деформируемости, а, следовательно, к нарушению гемоперфузии сетчатки и тканевой гипоксии [20, 135, 149, 152]. Гликирование коллагена базальной мембраны сосудов сетчатки приводит к увеличению ее толщины и снижению эластичности [214, 251]. Гликирование кристаллинов, накопление КПП в хрусталиках приводит к снижению их прозрачности [74, 142, 151, 158, 167, 210, 225, 235, 322, 425]. Неясен механизм влияния неферментативного гликирования на уровень ВГД, однако такая связь, вероятно, существует [203, 279, 373].

За последние 5 лет были опубликованы экспериментальные данные об эффективности препаратов растительного происхождения против прогрессирования диабетической ретинопатии [81, 350, 358, 378, 370, 423], также есть данные об эффективности флавоноидов, апокаротиноидов, карнозина, L-лизина, цинка и др. против диабетического катарактогенеза [96, 108, 109, 141, 227, 299].

В данной работе был проведен направленный поиск соединения-лидера по антигликирующей активности среди новых производных азоло[5,1-С]-1,2,4-триазина (6 соединений с лабораторным шифром АВ и 6 соединений с лабораторным шифром IS), синтезированных в ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» (г. Екатеринбург). Реакцию гликирования БСА воспроизводили по методу Jedsadayamata A. [31, 221] и определяли антигликирующую активность по уровню ингибирования флуоресценции гликированного БСА. В качестве вещества сравнения был выбран амингуанидин, как соединение, проявляющее известные в литературе антигликирующие свойства за счет его способности нейтрализовывать высокореакционноспособные гликирующие агенты – дикарбонильные соединения [226, 387]. В результате эксперимента было определено, что наибольшую антигликирующую способность проявило соединение с лабораторным шифром АВ-19 (натриевая соль диэтилового эфира 4-оксо-1,4-дигидропирозололо[5,1-С]-1,2,4-триазин-3,8-дикарбоновой кислоты, моногидрат) (Рисунок 8.1). Было получено снижение уровня флуоресценции гликированного бычьего сывороточного альбумина на 88,76 % у соединения АВ-19 против 79,86 % у АВ-20,

66,92 % у IS-219, и 57,83 % у амингуанидина при концентрации антигликирующих соединений 10^{-3} М.

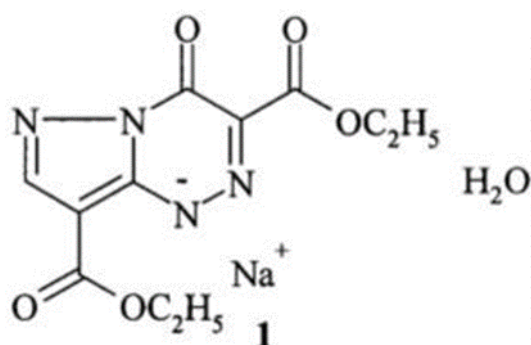


Рисунок 8.1 – Химическое строение соединения АВ-19

Для наиболее активных антигликирующих соединений (АВ-19 и АВ-20) были исследованы концентрационные зависимости антигликирующей активности, вычислены показатели IC_{50} . Показатели IC_{50} составили 53,96 μ М для соединения АВ-19, 338,55 μ М для соединения АВ-20, и – 765,00 μ М для вещества сравнения. Таким образом, наилучший показатель был выявлен у соединения АВ-19, которое по величине IC_{50} в 14 раз превосходило амингуанидин.

Подструктурный анализ влияния типа ядра показал, что более выраженными антигликирующими свойствами обладает ряд пиразолотриазин. Далее наличие этокарбокисильного заместителя в положениях C^3 и C^8 в структуре соединения АВ-19 делает его лидером по антигликирующей активности среди изучаемых производных. Замена этокарбонильного радикала на иной заместитель в любом из названных положений атома углерода в гетероцикле приводит к снижению антигликирующей активности соединения.

Кроме того, соединение АВ-19 оказалось менее токсичным в сравнении с амингуанидином (показатель LD_{50} 1,534 mM у АВ-19 против 5,089 mM у амингуанидина), а по широте терапевтического действия в 4,27 раза превосходило препарат сравнения, клинические испытания которого были остановлены связи с его высокой токсичностью [259].

Таким образом, для дальнейшего изучения *in vivo* влияния нового производного азолотриазина на развитие отдаленных последствий сахарного диабета на орган зрения было выбрано новое производное азолотриазина - соединение АВ-19, обладающее наибольшей антигликирующей активностью и имеющее ряд преимуществ над наиболее известным антигликирующим препаратом аминогуанидином как по антигликирующему, так и по терапевтическому потенциалу.

Стрептозотоцин-индуцированная модель сахарного диабета 1 типа была выбрана как одна из самых релевантных и эксплуатируемых в экспериментальной практике для исследования глазных последствий заболевания [137, 148, 245, 300, 308, 421]. Таким образом моделируется развитие в экспериментальных условиях (чаще всего у крыс и мышей) диабетического катарактогенеза, нейро- и ретинопатии, диабетической неоваскуляризации, офтальмогипертензии. Развитие тяжелой гипергликемии у крыс (не менее 15 ммоль/л) подтверждалось регулярным контролем уровня глюкозы в крови. Влияние аминогуанидина и соединения АВ-19 на гликемию, согласно полученным данным, отсутствовало, что позволяет предположить, что выявленные антидиабетические эффекты соединений связаны с их антигликирующими свойствами.

Согласно биомикроофтальмоскопическому контролю к моменту завершения эксперимента (90 день) у крыс из контрольной группы сахарного диабета (контрольная группа № 2) появились помутнения как в кортикальных, так и в ядерных слоях хрусталиков, соответствующие 2,3 баллам по используемой шкале. Это достоверно отличается от показателей контрольной группы № 1 (интактные животные), подтверждает адекватность выбранной экспериментальной модели сахарного диабета и согласуется с данными из литературных источников [148, 253, 308, 421]. В то же время и аминогуанидин, и соединение АВ-19 явно замедляли диабетический катарактогенез у лабораторных животных (помутнения в хрусталиках достигали лишь 0,7 и 0,6 баллов соответственно), что статистически значимо отличается от степени развития катаракты у крыс из контрольной группы сахарного диабета.

Данные прижизненного обследования хрусталиков соответствуют патогистологической картине у лабораторных животных в рамках эксперимента: у интактных крыс отсутствовали какие-либо изменения структуры хрусталика, у диабетических животных из контрольной группы № 2 – присутствовали прогрессирующие патоморфологические признаки деградации, главным образом, эпителиальных клеток передней капсулы хрусталика (ЭКХ) и хрусталиковых волокон. Данные изменения вещества хрусталика оценивались в 2 балла по разработанной шкале оценки степени развития катаракты. Ингибирующее влияние аминогуанидина и соединения АВ-19 (1,4 и 1,75 баллов соответственно) на формирование диабетической катаракты было выявлено в ходе патоморфологического исследования, однако, в отличие от данных биомикроофтальмоскопии, разница не была статистически значима в сравнении с группой контроля сахарного диабета.

В литературе описывается, что аминогуанидин способен ингибировать диабетический катарактогенез, как при местном [150], так и при системном введении [362] у крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом за счет снижения накопления в хрусталиках конечных продуктов гликирования (КПГ). Повышение содержания КПГ в хрусталике приводит к изменению его цвета и снижению прозрачности [142, 202, 227, 374]. Реакция кросслинкинга между КПГ и хрусталиковыми белками (основная часть из которых кристаллины) приводит к формированию белковых агрегатов с высокой молекулярной массой (ВММ) за счет формирования меж- и внутримолекулярных поперечных сшивок, сопровождающихся конформационными преобразованиями, что закономерно приводит к снижению прозрачности хрусталика путем образования в нем фокусов светорассеяния и снижения показателя светопреломления [9, 10, 74, 141]. К тому же, посредством активации рецептор–опосредованных сигнальных путей КПГ потенцируют окислительный стресс и проапоптотические процессы в клетках, что затрагивает биохимически активные ЭКХ [69, 247]. В конечном счете это приводит к появлению патоморфологических признаков катаракты, которые наблюдались по данным микроскопии в настоящем исследовании.

По результатам иммуноферментного анализа у крыс из контрольной группы сахарного диабета было обнаружено достоверное повышение содержания КПП в хрусталиках в сравнении с интактными животными (546,22 мкг/кг против 280 мкг/кг соответственно). Согласно литературным источникам, данная тенденция характерна для диабетического катарактогенеза [68, 74, 114, 125, 171]. Отдельно исследовалось содержание карбоксиметиллизина в хрусталиках, как одного из основных КПП, накапливающихся в хрусталиках при формировании диабетической катаракты [110]. Результаты показывают избыточное накопление КМЛ в хрусталиках при стрептозотоцин-индуцированном диабете (2,56 мкг/кг в контрольной группе № 2 против 1,62 мкг/кг в контрольной группе № 1). Как и описывалось в литературных источниках, аминогуанидин приводил к снижению накопления в хрусталиках диабетических крыс, как КПП на 39 %, так и КМЛ на 31,3 %, по сравнению с животными из контрольной группы № 2 (сахарный диабет) [150, 362]. Однако влияние соединения АВ-19 было более выраженным: содержание КПП в хрусталиках было ниже на 47,9 %, а КМЛ на 47,7 %, по сравнению с крысами из группы контроля сахарного диабета. Причем ингибирующий эффект обоих антигликирующих соединений на повышенное образование КПП и КМЛ в хрусталиках было статистически значимым (при $p < 0,05$).

Таким образом, объективные экспериментальные данные, полученные как с помощью клинического метода диагностики, так и лабораторных методов исследования хрусталика, продемонстрировали антикатарактальный эффект изучаемого производного пиразолотриазина и препарата сравнения. Соединение АВ-19 в эксперименте *in vitro* показало более высокую антигликирующую активность, чем аминогуанидин. Данная закономерность прослеживается на животной модели диабетического катарактогенеза: меньшее накопление КПП в хрусталиках тяжелой форме гипергликемии приводит к достоверному торможению формирования катаракты, однако не останавливает его полностью.

Параллельно исследованию хрусталика изучалось влияние соединения АВ-19 на изменения структуры и функции сетчатки в условиях экспериментального

диабета. Раннее развитие катаракты у диабетических животных и снижение прозрачности оптических сред затруднило непосредственный офтальмоскопический контроль за состоянием глазного дна. Однако функциональные методы исследования и патоморфологическое изучение микропрепаратов сетчатки позволили многосторонне проанализировать влияние соединения АВ-19 и препарата сравнения на развитие диабетической ретинопатии (ДР).

Различные биохимические компоненты патогенеза ДР, каждое из которых непосредственно связано с интенсифицированным процессом неферментативного гликирования при длительной гипергликемии, что подробно описывается в Главе 1 настоящей работы, приводят к развитию микрососудистых нарушений и ишемически-гипоксического повреждения всех структур органа зрения, на которые глаз отвечает компенсаторным, но морфологически и функционально неполноценным неоангиогенезом [127, 240, 405, 428].

Проведенная в рамках экспериментальной части лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ) позволяет исследовать микрогемоперфузию зондируемого отрезка конъюнктивы, склеры, периферических отделов сетчатки и хориоидеи [29, 103]. У крыс из контрольной группы сахарного диабета было выявлено прогнозируемое согласно данным литературы снижение на 40,5 % уровня глазной микроциркуляции, по сравнению с интактными животными (при $p < 0,05$) [199, 241, 329]. Оба антигликирующих соединения положительно влияли на уровень перфузии ишемизированных тканей у диабетических животных: наблюдалось повышение уровня глазной микроциркуляции на 20,4 % у крыс, получавших аминоксантидин, и на 26,9 % у крыс, получавших соединение АВ-19, по сравнению с животными из контрольной группы № 2.

Также о развитии ретинальной гипоксии и сопутствующей дегенерации нейронных и глиальных элементов сетчатки при сахарном диабете говорит снижение амплитуды ретинального электрофизиологического ответа [32, 223, 353, 358]. Нейродегенерация фоторецепторов вплоть до апоптоза является неотъемлемым компонентом патогенеза ДР и проявляется снижением амплитуды

а-волны электроретинограммы [350, 354, 370]. Таким же путем поражение глиальных элементов сетчатки, составляющих так называемый нейрососудистый комплекс сетчатки (главная роль в котором принадлежит клеткам Мюллера) и нейродегенерация биполярных клеток приводят к снижению амплитуды b-волны электроретинограммы [189, 193, 302]. В итоге ЭРГ-индекс b/a является результирующим показателем, отражающий электрогенез сетчатки в целом [46, 64].

По результатам проведенной скотопической электроретинографии (ЭРГ) было выявлено снижение значения индекса b/a у лабораторных животных из контрольной группы № 2 (сахарный диабет) более, чем в 2 раза относительно данного показателя у интактных крыс (0,27 против 0,57 соответственно при $p < 0,05$), что, согласно опубликованным данным [489, 513], показывает снижение биоэлектрической активности сетчатки при сахарном диабете. Однако у диабетических крыс, получавших аминогуанидин, наблюдалось повышение индекса b/a на 74 %, по сравнению с крысами из группы контроля сахарного диабета, что в целом согласуется с литературными данными и, вероятно, связано с уменьшением образования КПП, рКПП, маркеров окислительного стресса и воспаления, а также признаков апоптоза в сетчатке диабетических животных [82, 408]. В то же время у животных, получавших соединение АВ-19, повышение индекса b/a составило 100 % (при $p < 0,05$), по сравнению с контрольными животными из группы сахарного диабета, фактически достигая значения индекса b/a у интактных животных.

Следовательно, оба антигликирующих соединения, позитивно влияя на функциональные изменения при гипергликемии: показатели электрофизиологического ответа сетчатки и глазной гемомикроперфузии, – продемонстрировали нейроретинопротективные свойства при некомпенсированном сахарном диабете.

Однако в рамках настоящей работы были изучены и морфологические аспекты нейродегенерации сетчатки, а именно линейная клеточная плотность ядер ганглиозного слоя сетчатки (ЛКП). Как описано в Главе 1, явления апоптоза

ганглиозных клеток при диабетической ретинопатии были экспериментально подтверждены в ряде работ [236, 196, 244, 261, 275]. Так, у крыс из контрольной группы № 2 отмечалось достоверное снижение ЛКП ганглиозных слоя на 22,2 % (при $p < 0,05$), по сравнению с интактными животными, аналогичные изменения наблюдались и у диабетических животных, получавших препарат сравнения, хотя в литературе присутствуют упоминания, что аминогуанидин уменьшает потери ганглиозных клеток при экспериментальном сахарном диабете на фоне снижения накопления КПП в сетчатке [90]. Однако соединение АВ-19 способствовало сохранению количества ганглиозных клеток на уровне контрольной группы № 1 (интактные), таким образом минимизируя обусловленные апоптозом изменения в сетчатке при сахарном диабете.

Отдельно следует сказать о влиянии антигликирующих соединений на уровень внутриглазного давления (ВГД). Как описывается в работе Jung и др. [223], у крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом отмечается не только повышение среднего уровня ВГД, но и увеличение его суточных колебаний, чему уделяется особое внимание в клинической практике. В данном эксперименте у крыс из контрольной группы сахарного диабета наблюдалось достоверное повышение ВГД в среднем на 4,3 мм рт. ст. (при $p < 0,05$), по сравнению с интактными животными. В группе животных, получавших аминогуанидин, уровень ВГД не отличался от показателей животных из контрольной группы № 2. Однако соединение АВ-19 проявило офтальмогипотензивный эффект, возвращая уровень ВГД у диабетических крыс до показателей контрольной группы № 1 (интактные). Предположительно, данный результат связан с более выраженными антигликирующими свойствами соединения АВ-19, по сравнению с аминогуанидином, выявленными *in vitro*. Данные о влиянии аминогуанидина на ВГД при сахарном диабете в литературе отсутствуют, хотя есть информация, что аминогуанидин не оказывал воздействия на ВГД при однократном внутривенном введении при лазер-индуцированной глаукоме у кроликов [153]. Вероятно, требуется пролонгированное изучение влияния веществ, обладающих антигликирующей активностью, на экспериментальную офтальмогипертензию.

В патогенез ишемически-гипоксического поражения сетчатки вносит вклад измененная гемореология, а именно развившийся синдром гипервязкости крови, и её фармакологическая коррекция благоприятно влияет на течение диабетической ретинопатии [87, 237]. Далее в настоящем эксперименте было изучено влияние производного пиразолотриазина на деформируемость эритроцитов при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете и эритроцитов, обработанных активным гликирующим интермедиатом в реакции неферментативного гликирования – глиоксалем для моделирования реакции Майяра *in vitro*. Предполагается, что реакция между белками эритроцитарной мембраны, гемоглобином, с одной стороны, и карбонильными соединениями (в том числе глиоксалем), КППГ – с другой, приводит к повышению жесткости мембран эритроцитов, однако применение антигликирующего соединения – аминугуанидина, улучшает их деформируемость [135, 149, 152]. Как и прогнозировалось, согласно литературным данным, у лабораторных животных со стрептозотоцин-индуцированным диабетом наблюдалось снижение индекса удлинения эритроцитов (ИУЭ) на 18 % (при $p < 0,05$) [389]. Этот же показатель у эритроцитов, обработанных глиоксалем, показал еще более явное снижение на 60 %, по сравнению с интактными эритроцитами у тех же животных (при $p < 0,05$). У диабетических крыс, получавших аминугуанидин и соединение АВ-19, наблюдалось повышение значений ИУЭ на 11 % и 8 % соответственно (при $p < 0,05$). В эксперименте *in vitro* гемореологический эффект обоих соединений был еще более выражен и носил дозозависимый характер (см. Глава 4). При концентрации соединений 5 mM аминугуанидин улучшал показатель деформируемости эритроцитов, обработанных глиоксалем, на 39,1 %, а соединение АВ-19 – на 53,3 %. Таким образом, соединения, обладающие доказанной антигликирующей активностью, проявили способность улучшать деформируемость эритроцитов в условиях интенсифицированной реакции неферментативного гликирования и потенциально могут быть применены для терапевтического воздействия на микрососудистые осложнения сахарного диабета.

Однако аминогуанидин ранее в исследованиях на людях привел к ряду побочных эффектов [157, 181, 288, 341, 259]. Новое производное пиразолотриазина с лабораторным шифром АВ-19 по результатам данного эксперимента имеет LD₅₀ в 3,3 раза меньше, чем у аминогуанидина, соответственно соединение АВ-19 потенциально менее токсично, чем препарат сравнения. В тоже время еще одним преимуществом соединения АВ-19 является его условный терапевтический индекс, который в 4,27 раза выше, чем у аминогуанидина.

В результате изучения нейротоксикологического профиля соединения АВ-19 было установлено, что соединение АВ-19 в дозах 20, 100 и 200 мг/кг не оказывает влияния на функционально-поведенческий статус животных. Однако при увеличении дозировки до 400 мг/кг наблюдались типичные проявления интоксикации: снижение мышечного тонуса, гипотермия, седация, тахипноэ. В результате проведенного изучения выявлено, что для нейротоксикологических свойств соединения АВ-19 характерна дозозависимая активность. Была обозначена минимальная токсическая доза $400 \text{ мг/кг} \leq \text{ТД}_{\text{мин}} \leq 1000 \text{ мг/кг}$. Таким образом, для соединения АВ-19 характерно низкое токсическое действие в отношении поведения животных при многотестовом наблюдении по S. Irwin; данное вещество перспективно для углубленного доклинического изучения.

К преимуществу соединения АВ-19 можно отнести и отсутствие у него местнораздражающего действия при проведении высокочувствительной конъюнктивальной пробы как при использовании 0,2 %, так и 2 % суспензии. Однако требуется дальнейшее изучение местной фармакокинетики соединения АВ-19, его способность проникать через роговицу и склеру для достижения терапевтической концентрации во внутриглазной жидкости и витреальной полости.

Суммируя результаты всех проведенных исследований (см. Таблица 8.1), можно сделать заключение, что новое производное пиразолотриазина – соединение АВ-19 (наибольшая антигликирующая активность которого в ряду родственных производных пиразолотриазина объясняется наличием этокарбонильного заместителя в положениях C³ и C⁸), – уменьшает образование КПП как *in vitro* в

реакции гликирования БСА, так и *in vivo* по данным ИФА (в хрусталиках) на животной модели сахарного диабета 1 типа. Соединение АВ-19 продемонстрировало антикатарактальный, нейроретинопротективный, офтальмогипотензивный и гемореологический эффекты при системном введении в дозе 20 мг/кг при отсутствии местнораздражающего действия при местном применении в эквивалентной дозе. Экспериментально выявленные свойства соединения АВ-19 позволяют считать его перспективным для дальнейшего изучения фармакологических свойств данного соединения и создания на основе его нового лекарственного препарата для лечения глазных отдаленных последствий сахарного диабета.

Таблица 8.1 – Влияние соединения АВ-19 и амингуанидина на глазные осложнения сахарного диабета

Соединение	Исследованный параметр			
	Торможение катарактогенеза	Снижение внутриглазного давления	Уменьшение признаков ретинопатии	Улучшение гемореологических показателей
АВ-19	+	+	+	+
Амингуанидин	+	—	+	+

Примечания:

«+» - наличие влияния;

«-» - отсутствие влияния.

ВЫВОДЫ

1. Производные азоло[5,*l*-с]-1,2,4-триазина являются перспективным классом для поиска антигликирующих соединений (пиразоло[5,*l*-с]-1,2,4-триазины и триазоло[5,*l*-с]-1,2,4-триазины). Наибольшей антигликирующей активностью обладают производные пиразоло[5,*l*-с]-1,2,4-триазина.
2. Большой вклад в проявление антигликирующей активности вносит наличие этоксикарбонильного заместителя в положении C^3 и C^8 . Замена этокарбонильной группы в положениях C^3 и C^8 на карбонильную, или в положении C^3 на нитрогруппу, или в положении C^8 на цианогруппу или этинильный радикал приводит к снижению антигликирующей активности. При этом аминогруппа в положении C^3 приводит к инверсии антигликирующего эффекта.
3. По антигликирующей активности натриевая соль диэтилового эфира 4-оксо-1,4-дигидропиразоло[5,*l*-с]-1,2,4-триазин-3,8-дикарбоновой кислоты, моногидрат (соединение АВ-19) в 14 раз превосходит аминогуанидин, также соединение АВ-19 в 3,31 раза менее токсично, чем аминогуанидин, и превосходит последний по величине условного терапевтического индекса в 4,27 раза.
4. Соединение АВ-19 после внутрижелудочного введения в течение трех месяцев в дозе 20 мг/кг крысам со стрептозотоцин - индуцированным СД продемонстрировало тенденцию к задержке образования помутнения в хрусталиках и снизило внутриглазное давление на 70 %, ($p < 0,05$), по сравнению с диабетическими животными без лечения.
5. Соединение АВ-19 уменьшало содержание в хрусталиках конечных продуктов гликирования и карбоксиметиллизина на 52 % ($p \leq 0,05$) и демонстрировало тенденцию к снижению выраженности морфологических признаков патологии хрусталика у крыс с экспериментальным сахарным диабетом, по сравнению с диабетическими животными без лечения.

6. Соединение АВ-19 способствовало повышению уровня глазной гемомикроциркуляции на 20,4 % ($p < 0,05$), нормализовало биоэлектрическую активность сетчатки, по сравнению с лабораторными животными из контрольной группы сахарного диабета, повышая значения результирующего ЭРГ-индекса b/a на 100 % ($p < 0,05$);
7. Соединение АВ-19 способствовало достоверно сохранению количества ганглиозных клеток сетчатки у диабетических крыс на уровне интактных животных ($p < 0,05$), минимизируя морфологические проявления нейродегенерации при диабетической ретинопатии.
8. Соединение АВ-19 повышало индекс деформируемости эритроцитов *in vivo* на 8 % ($p < 0,05$) у животных со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом; увеличивало индекс деформируемости эритроцитов, обработанных глиоксалем на 53,3 % ($p < 0,05$) *in vitro*, при исследуемой концентрации соединения 5mM;
9. Соединение АВ-19 не обладает местнораздражающего действия на конъюнктиву глаза крысы в концентрациях 0,2 % и 2 % ($p < 0,05$).
10. Для соединения АВ-19 характерно низкое токсическое действие в отношении поведения животных при многотестовом наблюдении по S.Irwin. Минимальная токсическая доза (ТД_{мин}) для АВ-19 при внутрижелудочном введении составляет: $400 \text{ мг/кг} < \text{ТД}_{\text{мин}} \leq 1000 \text{ мг/кг}$.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Целесообразным является проведение дальнейшего синтеза соединений на основе производных пиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазина, имеющих этоксикарбонильный заместитель в положении С³ и С⁸ для оптимизации химических структур и разработки на их основе новых высокоэффективных антигликирующих средств;
2. Созданная методология изучения офтальмофармакологических эффектов соединений с антигликирующей активностью может быть использована при направленном поиске и доклиническом исследовании новых антигликирующих веществ;
3. Соединение АВ-19 (натриевая соль диэтилового эфира 4-оксо-1,4-дигидропиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-3,8-дикарбоновой кислоты) проявляет высокую антигликирующую активность и является перспективной субстанцией для дальнейшего расширенного доклинического изучения ее специфических фармакологических эффектов для коррекции глазных осложнений сахарного диабета.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АКМ – активные кислородные метаболиты

АР - альдозоредуктаза

ВГД – внутриглазное давление

ГОб – гематоофтальмический барьер

ДР – диабетическая ретинопатия

ИЛ – интерлейкин

КМЛ – карбоксиметиллизин

КППГ – конечные продукты гликирования

ЛДФ – лазерная доплеровская флоуметрия

ЛКП – линейная клеточная плотность

ПОЛ – перокисное окисление липидов

рКППГ – рецепторы конечных продуктов гликирования

СД – сахарный диабет

ФНО α – фактор некроза опухоли α

ЭРГ – электроретинография

НbA1с – гликированный гемоглобин

ICAM -1 – молекула межклеточной адгезии 1-го типа

NO – оксид азота (II)

VCAM – 1 – молекула адгезии сосудистого эндотелия 1-го типа

VEGF – фактор роста сосудистого эндотелия

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абашова Е. И. Роль конечных продуктов гликирования в репродукции / Е. И. Абашова, М. И. Ярмолинская, О. Л. Булгакова // Проблемы репродукции. – 2019. – Т. 25, № 4. – С. 13-20. – DOI: 10.17116/gergo2019504113.
2. Азоло[5,1-с]-1,2,4-триазины - новый класс противовирусных соединений / В. Л. Русинов, Е. Н. Уломский, О. Н. Чупахин, В. Н. Чарушин // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2008. – № 5. – С. 967-996.
3. Аметов А. С. Окислительный стресс при сахарном диабете 2-го типа и пути его коррекции / А. С. Аметов, О. Л. Соловьева // Проблемы эндокринологии. – 2011. – Т. 57, № 6. – С. 52-56.
4. Ансари Н. А. Неферментативное гликирование белков: от диабета до рака / Н. А. Ансари, З. Рашид // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56, № 2. – С. 168-178. – DOI: 10.18097/pbmс20105602168.
5. Апоптоз в развитии ремиссии сахарного диабета 1 типа / Т. В. Никонова, С. А. Прокофьев, В. А. Горелышева [и др.] // Сахарный диабет. – 2006. – № 4. – С. 47-50.
6. Астахов Ю. С. Является ли сахарный диабет фактором риска развития первичной открытоугольной глаукомы? / Астахов Ю. С., Крылова И. С., Шадричев Ф. Е. // РМЖ. Клиническая Офтальмология. – 2006. – № 3. – С. 91.
7. Балаболкин М. И. Роль гликирования белков, окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений при сахарном диабете / М. И. Балаболкин // Сахарный диабет. – 2002. – Т. 5, № 4. – С. 8-16.
8. Беленький М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / Беленький М. Л. – 2-е изд., перераб. и доп. – Ленинград: Медгиз, 1963. – 146 с.
9. Влияние конечных продуктов глубокого гликирования на клеточные процессы / Т. С. Леонова, М. В. Вихнина, Т. В. Гришина [и др.] // Международный научно-исследовательский журнал. – 2018. – № 12-1(78). – С. 185-194. – DOI: 10.23670/IRJ.2018.78.12.034.

10. Влияние производного пиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазина на катарактогенез при экспериментальном сахарном диабете / А. А. Спасов, Л. В. Наumenко, Ю. А. Говорова [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2021. – Т. 84, № 5. – С. 27-31. – DOI 10.30906/0869-2092-2021-84-5-27-31.
11. Давыдов В. В. Карбонильный стресс как неспецифический фактор патогенеза (обзор литературы и собственных исследований) / В. В. Давыдов, А. И. Божков // Журнал НАМН України. – 2014. – Т. 20, № 1. – С. 25-34.
12. Данилова Л. А. Гликированные протеины / Л. А. Данилова // Педиатр. – 2019. – Т. 10, № 5. – С. 79-86. – DOI: 10.17816/ PED10579-86.
13. Дедух Н. В. Апоптоз / Дедух Н.В., Поворознюк В. В. // Боль. Суставы. Позвоночник. – 2011. – № 2. – С. 66-69.
14. Деформация эритроцитов: роль в микроциркуляции / А. В. Муравьев, В. Л. Комлев, П. В. Михайлов [и др.] // Ярославский педагогический вестник. – 2013. – Т. 3, № 2. – С. 93-102.
15. Диабетическая глаукома: особенности клиники и лечения / Д. В. Липатов, Т. А. Чистяков, А. Г. Кузьмин [и др.] // Эндокринная хирургия. – 2011. – № 1. – С. 21-28.
16. Доклиническое изучение лекарственных средств (промышленная фармация) / Ж. И. Аладышева, В. В. Береговых, Н. Н. Вольхин [и др.]. – Москва: Ремедиум, 2021. – 400 с. – ISBN 978-5-906499-72-1.
17. Евграфов В. Ю. Катаракта / В. Ю. Евграфов, Ю. Е. Батманов. – Москва: Медицина, 2005. – 364 с. – ISBN 5-225-04692-4.
18. Емельянов В. В. Гликирование, антигликирование и дегликирование: роль в механизмах старения и геропротекции (обзор литературы) / В. В. Емельянов // Успехи геронтологии. – 2016. – Т. 29, № 3. – С. 407-416.
19. Изменение функции нейронов сетчатки и глиальных клеток Мюллера у больных сахарным диабетом 2-го типа при лечении диабетической ретинопатии ингибитором ангиотензинпревращающего фермента / М. В. Зуева, И. В. Цапенко, М. В. Рябина [и др.] // Вестник офтальмологии. – 2013. – Т. 129, № 3. – С. 44-47.

20. Изменения реологических свойств крови при сахарном диабете / А. А. Фабричнова, Д. А. Куликов, И. В. Мисникова [и др.] // Эндокринология. Новости. Мнения. Обучение. – 2018. – Т. 7, № 2(23). – С. 26-34. – DOI 10.24411/2304-9529-2018-12002.
21. Изменения реологических свойств крови у больных с метаболическим синдромом / А. М. Шилов, А. С. Авшалумов, Е. Н. Синицина [и др.] // РМЖ. – 2008. – Т. 16, № 4. – С. 200-204.
22. Исследование состояния микроциркуляции переднего сегмента глаза методом лазерной доплеровской флоуметрии у детей с различными видами рефракции / Х. П. Тахчиди, М. Л. Митронина, Л. С. Потапова, В. В. Сидоров // Офтальмохирургия. – 2011. – № 4. – С. 49-53.
23. Калижникова Е. А. Пути оттока внутриглазной жидкости из глаза: единство и различие / Е. А. Калижникова, О. И. Лебедев, Г. М. Столяров // РМЖ. Клиническая Офтальмология. – 2014. – № 2. – С. 90.
24. Каталин: [описание препарата Каталин® (таблетки для приготовления глазных капель, 0.75 мг основано на официальной инструкции, утверждено компанией-производителем в 2014 году)]. – Текст: электронный // РЛС. Регистр лекарственных средств. – URL: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_1689.htm (дата обращения: 10.08.2022)
25. Кашинцева Л. Т. Патогенетическая роль изменений дренажного аппарата глаза в развитии глаукомного процесса у больных сахарным диабетом / Л. Т. Кашинцева // Офтальмологический журнал. – 1971. – Т. 26, № 5. – С. 381-386.
26. Кнорре Д. Г. Химические и функциональные аспекты посттрансляционной модификации белков / Д. Г. Кнорре, Н. В. Кудряшова, Т. С. Годовикова // Acta Naturae (русскаяязычная версия). – 2009. – Т. 1, № 3. – С. 32-56.
27. Ковалев Д. Г. Нейротоксикологический профиль новых производных аденина, обладающих противовирусной активностью / Д. Г. Ковалев, Л. И. Бугаева, А. А. Озеров // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2010. – Т. 6. – № .2. – С. 253-256.

28. Королева И. А. Метаболизм хрусталика: особенности и пути коррекции / И. А. Королева, А. Е. Егоров // РМЖ. Клиническая офтальмология. – 2015. – Т. 15, № 4. – С. 191-195.
29. Коррекция экспериментальной ангиопатии сетчатки по гипертоническому типу миноксидилом, силденафилом / А. А. Пересыпкина, В. О. Губарева, Е. А. Левкова [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. – 2017. – № 1(162). – С. 109-115.
30. Кочемасова Т. В. Состояние эндотелия и адгезия лейкоцитов при сахарном диабете / Т. В. Кочемасова // Сахарный диабет. – 2000. – № 3. – С. 59-62.
31. Кузнецова В.А., Соловьева О.А., Мацевич А.И., Спасов А.А. Метод оценки антигликирующей активности *in vitro* новых веществ / В. А. Кузнецова, О. А. Соловьева, А. И. Мацевич, А. А. Спасов // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2014. – № 3. – С. 50-51.
32. Кулыбышева В. С. Нейродегенеративные изменения сетчатки у пациентов с сахарным диабетом / В. С. Кулыбышева, И. А. Ронзина, А. А. Гамидов // Вестник офтальмологии. – 2019. – Т. 135, № 5. – С. 31-37.
33. Левин Г. Я. Связь деформируемости эритроцитов с гликированием гемоглобина и образованием микровезикул / Г. Я. Левин, Е. Г. Сухарева // Сибирский научный медицинский журнал. – 2015. – Т. 35. – № 2. – С. 37-42.
34. Мальцев Е. В. Биологические особенности и заболевания хрусталика: монография / Мальцев Е. В., Павлюченко К. П. – Одесса: Астропринт, 2002. – 448 с.
35. Маркёры апоптоза и методы изучения апоптотической гибели клеток / Фролов М. А., Слепова О. С., Ловпаче Дж. Н., Морозова Н. С. // Глаукома: теории, тенденции, технологии: сборник научных статей XI международного конгресса. – Москва, 2013. – С. 267-270.
36. Маслова, О.В. Оценка эффективности лечебной помощи больным СД по данным скрининга микрососудистых осложнений: дис. канд. мед. наук: 14.01.02 / Маслова Оксана Владимировна. – Москва, 2011. – 140 с.

37. Микроскопическая техника: руководство для врачей и лаборантов / ред. Д. С. Саркисов, Ю. Л. Перов. – Москва: Медицина, 1996. – 544 с. – ISBN: 5-225-02820-9.
38. Муранов К. О. Молекулярная физиология и патология хрусталика глаза / К. О. Муранов, М. А. Островский. – Москва: Торус Пресс, 2013. – 295 с.: ил. – ISBN 978-5-94588-130-3.
39. Национальное руководство по глаукоме: для практикующих врачей / под ред. Е. А. Егорова, В. П. Еричева. – 4-е издание, испр. и доп. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2019. – 384 с.: ил. – ISBN 978-5-9704-5492-3.
40. Нероев, В. В. Заболеваемость диабетической ретинопатией в Российской Федерации по данным Федеральной статистики / В. В. Нероев, О. В. Зайцева, Л. А. Михайлова // Российский офтальмологический журнал. – 2018. – Т. 11, № 2. – С. 5-9.
41. Офтальмология: клинические рекомендации / под ред. В. В. Нероева. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. – 504 с.: ил. – ISBN 978-5-9704-5853-2.
42. Офтальмология: национальное руководство / под ред. С. Э. Аветисова, Е. А. Егорова, Л. К. Мошетовой [и др.] – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2022. – 904 с. – (Серия «Национальные руководства»). – ISBN 978-5-9704-6585-1.
43. Офтальмология. Фармакотерапия без ошибок: руководство для врачей / под редакцией Ю. С. Астахова, В. П. Николаенко. – 2-е издание, перераб. и доп. – Москва: Е-noto, 2021. – 799 с. – (Фармакотерапия без ошибок). – ISBN 978-5-906023-28-5.
44. Оценка изменения глазного кровотока под влиянием сосудистого эндотелиального фактора роста методами ультразвуковой доплерографии / В. В. Нероев, Т. Н. Киселева, М. В. Рябина [и др.] // Сибирский научный медицинский журнал. – 2015. – Т. 35, № 1. – С. 5-8.
45. Оценка состояния глазного кровотока в норме и при гипергликемии на основании данных ультразвукового исследования в эксперименте /

- В. В. Нероев, Т. Н. Киселева, М. В. Рябина [и др.] // Вестник офтальмологии. – 2013. – Т. 129, № 2. – С. 14-18.
46. Оценка состояния электрогенеза сетчатки при ультрафиолетовом спектрофлуориметрическом исследовании глаза / В. В. Нероев, В. В. Гарькавенко, Л. А. Шапиро, В. В. Салмин // Российский офтальмологический журнал. – 2020. – Т. 13, № 2. – С. 41-44. – DOI 10.21516/2072-0076-2020-13-2-41-44.
 47. Патент № 2612300 С1 Российская Федерация, МПК C07D 487/04, A61K 31/53. Натриевая соль диэтилового эфира 4-оксо-1,4-дигидропиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-3,8-дикарбоновой кислоты, моногидрат: № 2015147151: заявл. 02.11.2015: опубл. 06.03.2017 / В. Л. Русинов, О. Н. Чупахин, В. Н. Чарушин [и др.].
 48. Патогенез сахарного диабета 1 типа и экспериментальные модели на лабораторных грызунах / И. Г. Гвазава, О. С. Роговая, М. А. Борисов [и др.] // Acta Naturae (русскаяязычная версия). – 2018. – Т. 10, № 1(36). – С. 25-35.
 49. Пекарева Е. В. Роль апоптоза в патогенезе сахарного диабета 1 типа / Пекарева Е. В., Никонова Т. В., Смирнова О. М. // Сахарный диабет. – 2010. – № 1. – С. 45-49. – DOI: 10.24412/2072-0378-2010-1-45-49.
 50. Показатели протеиназно–ингибиторного баланса крови и гиперлипопротеидемии у больных пролиферативной диабетической ретинопатией с кровоизлиянием в стекловидное тело / Чеснокова Н. Б., Кузнецова Т. П., Давыдова Г. А., Григорьев А. В. // Вестник офтальмологии. – 1999. – № 6. – С. 29-32.
 51. Роль сахарного диабета в возникновении и развитии эндотелиальной дисфункции / Попыхова Э. Б., Степанова Т. В., Лагутина Д. Д. [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 2020. – Т. 6, № 1. – С. 47-55. – DOI: 10.14341/probl12212.
 52. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Минздравсоцразвития России; отв. ред. А. Н. Миронов. – Москва: Гриф и К, 2012. – 944 с. – ISBN 978-5-8125-1466-3.

53. Сахарный диабет в Российской Федерации: распространенность, заболеваемость, смертность, параметры углеводного обмена и структура сахароснижающей терапии по данным Федерального регистра сахарного диабета, статус 2017 г. / И. И. Дедов, М. В. Шестакова, О. К. Викулова [и др.] // Сахарный диабет. – 2018. – Т. 21, № 3. – С. 144-159. – DOI: 10.14341/DM9686.
54. 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.
55. Спасов А. А. Гликирование белков при сахарном диабете и возможности его фармакологической коррекции (обзор) / А. А. Спасов, О. А. Соловьева, В. А. Кузнецова // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – Т. 51, № 6. – С. 3-7. – DOI: 10.30906/0023-1134-2017-51-6-3-7.
56. Спасов А. А. Основы диабетического катарактогенеза и перспективные пути его фармакологической коррекции / А. А. Спасов, Л. В. Наumenко, Ю. А. Говорова // Acta Biomedica Scientifica. – 2021. – Т. 6, № 2. – С. 114-125. – DOI: 10.29413/ABS.2021-6.2.13.
57. Стаценко М. Е. Функциональное состояние почек, ригидность магистральных артерий и сосудистый возраст у пациентов с артериальной гипертензией и сахарным диабетом 2 типа / М. Е. Стаценко, М. В. Деревянченко // Нефрология. – 2019. – Т. 23, № 3. – С. 42-48. – DOI 10.24884/1561-6274-2019-23-3-42-48.
58. Фундаментальные основы поиска лекарственных средств для терапии сахарного диабета 2-го типа / А. А. Спасов, В. И. Петров, Н. И. Чепляева, К. В. Ленская // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. – Т. 68, № 2. – С. 43-49. – DOI 10.15690/vramn.v68i2.548.
59. Хирургия катаракты при сахарном диабете / С. Ю. Копаев, Н. В. Пыцкая, В. Г. Копаева, А. Ю. Меньшиков // Практическая медицина. – 2017. – Т. 2, № 9 (110). – С. 103-106.

60. Шамшинова А. М. Электроретинография в офтальмологии / А. М. Шамшинова. – Москва: Медика, 2009. – 304 с.
61. Шульпина Н. Б. Орган зрения при сахарном диабете / Н. Б. Шульпина, З. А. Алиева, Л. И. Нудьга // Терапевтическая офтальмология / под ред. М. Л. Краснова, Н. Б. Шульпиной. – Москва: Медицина, 1985. – С. 510-537.
62. Экспериментальные модели сахарного диабета 1-го типа / М. И. Ярмолинская, Н. Ю. Андреева, Е. И. Абашова, Е. В. Мишарина // Журнал акушерства и женских болезней. – 2019. – Т. 68, № 2. – С. 109-118.
63. Электрическая активность сетчатки у крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом / Е. М. Ключихина, А. К. Ердяков, М. П. Морозова [и др.] // Сахарный диабет. – 2018. – Т. 21, № 5. – С. 356-363. – DOI 10.14341/DM9490.
64. Электрофизиологические и гистоморфометрические изменения в сетчатке крыс при фармакологическом прекондиционировании эритропозтином, никорандилом на модели ишемии-реперфузии глаза / А. А. Пересыпкина, М. В. Покровский, А. С. Шабельникова [и др.] // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2014, № 11-1(182). – С. 113-117.
65. Эпидемиологические характеристики сахарного диабета в Российской Федерации: клинико-статистический анализ по данным Федерального регистра сахарного диабета на 01.01.2021 / И. И. Дедов, М. В. Шестакова, О. К. Викулова [и др.] // Сахарный диабет. – 2021. – Т. 24, № 3. – С. 204-221. – DOI: 10.14341/DM12759.
66. Эпидемиология и регистр диабетической ретинопатии в Российской Федерации / Липатов Д. В., Александрова В. К., Атарщиков Д. С. [и др.] // Сахарный диабет. – 2014. – № 1. – С. 4-7.
67. A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy / Antonia M. Joussen, Vassiliki Poulaki, Minh Ly Le [et al.] // FASEB. J. – 2004. – Vol. 18, № 12. – P. 1450-1452. – DOI: 10.1096/fj.03-1476fje.

68. Accumulation of argpyrimidine, a methylglyoxal-derived advanced glycation end product, increases apoptosis of lens epithelial cells both in vitro and in vivo / Junghyun Kim, Ohn Soon Kim, Chan-Sik Kim [et al.] // *Exp Mol Med.* – 2012. – Vol. 44, № 2. – P. 167-175. – DOI: 10.3858/emm.2012.44.2.012.
69. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE / M. P. Wautier, O. Chappey, S. Corda [et al.] // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* – 2001. – Vol. 280, № 5. – P. 685. – DOI: 10.1152/ajpendo.2001.280.5.E685.
70. Activation of nuclear factor-kappa B induced by diabetes and high glucose regulates a proapoptotic program in retinal pericytes / Giulio Romeo, Wei-Hua Liu, Veronica Asnaghi [et al.] // *Diabetes.* – 2002. – Vol. 51, № 7. – P. 2241-2248. – DOI: 10.2337/diabetes.51.7.2241.
71. Acute effects of insulin on aqueous humor flow in patients with type 1 diabetes / James T. Lane, Carol B. Toris, Samer N. Nakhle [et al.] // *Am J Ophthalmol.* – 2001. – Vol. 132, № 3. – P. 321-327. – DOI: 10.1016/s0002-9394(01)01048-0.
72. Advanced glycation end products-driven angiogenesis in vitro. Induction of the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular endothelial growth factor / Sho-ichi Yamagishi, Hideto Yonekura, Yasuhiko Yamamoto [et al.] // *J Biol Chem.* – 1997. – Vol. 272, № 13. – P. 8723-8730. – DOI: 10.1074/jbc.272.13.8723.
73. Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression / M. Lu, M. Kuroki, S. Amano [et al.] // *J Clin Invest.* – 1998. – Vol. 101, № 6. – P. 1219-1224. – DOI: 10.1172/JCI1277.
74. Advanced glycation endproducts in human diabetic and non-diabetic cataractous lenses / Rajko Pokupec, Miro Kalauz, Niksa Turk, Zdenka Turk // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* – 2003. – Vol. 241, № 5. – P. 378-384. – DOI: 10.1007/s00417-002-0616-2.
75. Aflibercept, bevacizumab, or ranibizumab for diabetic macular edema / Diabetic Retinopathy Clinical Research Network, John A. Wells, Adam R. Glassman

- [et al.] // *N Engl J Med.* – 2015. – Vol. 372, № 13. – P. 1193-1203. – DOI: 10.1056/NEJMoa1414264.
76. Age-related aqueous humor (AH) and lens epithelial cell/capsule protein carbonylation and AH protein concentration in cataract patients who have pseudoexfoliative diseases / Garyfallia Papadopoulou, Dimitrios Zisimopoulos, Electra Kalaitzopoulou [et al.] // *Mol Vis.* – 2018. – Vol. 24. – P. 890-901.
 77. AGEs-RAGE system down-regulates Sirt1 through the ubiquitin-proteasome pathway to promote FN and TGF-beta1 expression in male rat glomerular mesangial cells / Kai-Peng Huang, Cheng Chen, Jie Hao [et al.] // *Endocrinology.* – 2015. – Vol. 156. – P. 268-279. – DOI: 10.1210/en.2014-1381.
 78. Akhtar N. J. Conformational study of N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of recombinant alpha-crystallins / N. J. Akhtar, T. X. Sun, J. J. Liang // *Curr Eye Res.* – 1999. – Vol. 18, № 4. – P. 270-276. – DOI: 10.1076/ceyr.18.4.270.5364.
 79. Aldose reductase deficiency protects sugar-induced lens opacification in rats / Aramati B. M. Reddy, Ravinder Tammali, Rakesh Mishra [et al.] // *Chemico-biological interactions.* – 2011. – Vol. 191, № 1-3. – P. 346-350. – DOI: 10.1016/j.cbi.2011.02.028.
 80. Aldose reductase inhibition prevents development of posterior capsular opacification in an in vivo model of cataract surgery // *Investigative ophthalmology & visual science.* – 2018. – Vol 59, № 8. – P. 3591-3598. – DOI: 10.1167/iovs.18-23935.
 81. Aldose reductase, protein glycation inhibitory and antioxidant of Peruvian medicinal plants: the case of *Tanacetum parthenium* L. and its constituents / Seung Hwan Hwang, Hyun-Yong Kim, Yanymee N. Guillen Quispe [et al.] // *Molecules.* – 2019. – Vol. 24, № 10. – P. 2010. – DOI: 10.3390/molecules24102010.
 82. Alexander J. P. Involvement of protein kinase C in TNFalpha regulation of trabecular matrix metalloproteinases and TIMPs / J. P. Alexander, T. S. Acott // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2001. – Vol. 42, № 12. – P. 2831-2838.

83. Allen D. A. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications / D. A. Allen, M. M. Yaqoob, S. M. Harwood // *J Nutr Biochem.* – 2005. – Vol. 16. – P. 705-713. – DOI: 10.1016/j.jnutbio.2005.06.007.
84. Alterations in enzymatic antioxidant defence in diabetes mellitus – a rational approach / E. Szaleczky, J. Prechl, J. Fehér, A. Somogyi // *Postgrad Med J.* – 1999. – Vol. 75, № 879. – P. 13-17.
85. Alterations of hemorheological parameters and tubulin content in erythrocytes from diabetic subjects / Ayelén D. Nigra, Noelia E. Monesterolo, Juan F. Rivelli [et al.] // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2016. – Vol. 74. – P. 109-120. – DOI: 10.1016/j.biocel.2016.02.016.
86. Altered expression patterns of VEGF receptors in human diabetic retina and in experimental VEGF- induced retinopathy in monkey / Antonella N. Witmer, Harriet G. Blaauwgeers, Herbert A. Weich [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2002. – Vol. 43, № 3. – P. 849-857.
87. Altered red blood cell deformability-A novel hypothesis for retinal microangiopathy in diabetic retinopathy / Justin Kok Soon Tan, Xin Wei, Peter Agustinus Wong [et al.] // *Microcirculation.* – 2020. – Vol. 27, № 7. – P. e12649. – DOI: 10.1111/micc.12649.
88. Alvarado J. Trabecular meshwork cellularity in primary open-angle glaucoma and nonglaucomatous normal / Jorge Alvarado, Collin Murphy, Richard Juster // *Ophthalmology.* – 1984. – Vol. 91, № 6. – P. 564-579. – DOI: 10.1016/s0161-6420(84)34248-8.
89. Amelioration of hyperglycemia-induced oxidative damage in ARPE-19 cells by myricetin derivatives isolated from *Syzygium malaccense* / Bavani Arumugam, Uma Devi Palanisamy, Kek Heng Chua, Umah Rani Kuppusamy // *Journal of Functional Foods.* – 2020. – Vol. 67, № 1. – P. 103844.
90. Aminoguanidine protects against apoptosis of retinal ganglion cells in Zucker diabetic fatty rats / J. Kim, C.-S. Kim, E. Sohn [et al.] // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* – 2014. – Vol. 18, № 11. – P. 1573-1578.

91. Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature / Aurelie Nguyen Dinh Cat 1, Augusto C Montezano, Dylan Burger, Rhian M Touyz // *Antioxid Redox Signal.* – 2013. – Vol. 19, № 10. – P. 1110-1120. – DOI: 10.1089/ars.2012.4641.
92. Antiangiogenic therapy with anti-vascular endothelial growth factor modalities for diabetic macular oedema / Gianni Virgili, Mariacristina Parravano, Francesca Menchini, Massimo Brunetti // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2012. – № 12. – P. CD007419. – DOI: 10.1002/14651858.CD007419.pub3. Update in: *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;10:CD007419.
93. Anti-cataract effect of resveratrol in high-glucose-treated streptozotocin-induced diabetic rats / Yoshihiro Higashi, Kentaro Higashi, Asami Mori [et al.] // *Biol Pharm Bull.* – 2018. – Vol. 41, № 10. – P. 1586-1592. – DOI: 10.1248/bpb.b18-00328.
94. Anti-vascular endothelial growth factor for diabetic macular oedema: a network meta-analysis / Gianni Virgili, Mariacristina Parravano, Jennifer R. Evans [et al.] // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2017. – Vol. 6, № 6. – P. CD007419. – DOI: 10.1002/14651858.CD007419.pub5. Update in: *Cochrane Database Syst Rev.* 2018 Oct 16;10:CD007419.
95. Anti-vascular endothelial growth factor therapy and risk of traction retinal detachment in eyes with proliferative diabetic retinopathy: pooled analysis of five DRCR Retina Network randomized clinical trials / Neil M. Bressler, Wesley T. Beaulieu, Susan B. Bressler [et al.] // *Retina.* – 2020. – Vol. 40, № 6. – P. 1021-1028. – DOI: 10.1097/IAE.0000000000002633.
96. *Aphanothece sacrum* (Sur.) Okada prevents cataractogenesis in type 1 diabetic mice / Shiori Matsuda, Hikari Sugawa, Jun-Ichi Shirakawa [et al.] // *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* – 2017. – Vol. 63, № 4. – P. 263-268. – DOI: 10.3177/jnsv.63.263
97. Apoptotic cell death in the lens epithelium of rat sugar cataract / Yoshihiro Takamura, Eri Kubo, Shousai Tsuzuki, Yoshio Akagi // *Exp Eye Res.* – 2003. – Vol. 77, № 1. – P. 51-57. – DOI:10.1016/s0014-4835(03)00083-6.

98. Aqueous extract prepared from steamed red amaranth (*Amaranthus gangeticus* L.) leaves protected human lens cells against high glucose induced glycative and oxidative stress / Li-Wei Hsiao, Gregory J. Tsay, Mei-Chin Mong [et al.] // *J Food Sci.* – 2021. – Vol. 86, № 8. – P. 3686-3697. – DOI: 10.1111/1750-3841.15822.
99. Aqueous flow in galactose-fed dogs / Carol B. Toris, James T. Lane, Yoshio Akagi [et al.] // *Exp Eye Res.* – 2006. – Vol. 83, № 4. – P. 865-70. – DOI: 10.1016/j.exer.2006.04.005.
100. Ascorbate Suppresses VEGF Expression in Retinal Pigment Epithelial Cells / David W. Sant, Vladimir Camarena, Sushmita Mustafi [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2018. – Vol. 59, № 8. – P. 3608-3618. – DOI: 10.1167/iovs.18-24101.
101. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nepsilon-carboxymethyl-lysine- and Nepsilon-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin / Naila Ahmed, Ognian K. Argirov, Harjit S. Minhas [et al.] // *Biochem J.* – 2002. – Vol. 364, № Pt 1. – P. 1-14. – DOI: 10.1042/bj3640001.
102. Assessment of red blood cell deformability in type 2 diabetes mellitus and diabetic retinopathy by dual optical tweezers stretching technique / Rupesh Agrawal, Thomas Smart, João Nobre-Cardoso [et al.] // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 15873. – DOI:10.1038/srep15873.
103. Assessment of retinal and choroidal blood flow changes using laser Doppler flowmetry in rats / Simon Hétu, Mylène Pouliot, Ghassan Cordahi [et al.] // *Curr Eye Res.* – 2013. – Vol. 38, № 1. – P. 158-167. – DOI: 10.3109/02713683.2012.723296.
104. Assessment of structure, stability and aggregation of soluble lens proteins and alpha-crystallin upon non-enzymatic glycation: The pathomechanisms underlying cataract development in diabetic patients / Reza Yousefi, Sajjad Javadi, Sara Amirghofran [et al.] // *Int J Biol Macromol.* – 2016. – Vol. 82. – P. 328-338. – DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.036.

105. Association between a vascular endothelial growth factor gene polymorphism (rs2146323) and diabetic retinopathy: a meta-analysis / Ying Zeng, Fangjie Dai, Ke Yang [et al.] // BMC Ophthalmol. – 2015. – Vol. 15. – P. 163. – DOI: 10.1186/s12886-015-0155-3.
106. Association of VEGF gene polymorphisms with diabetic retinopathy in a south Indian cohort / Satagopan Uthra, Rajiv Raman, Bickol N. Mukesh [et al.] // Ophthalmic Genet. – 2008. – Vol. 29, № 1. – P. 11-15. – DOI: 10.1080/13816810701663527.
107. Aster koraiensis extract prevents diabetes-induced retinal vascular dysfunction in spontaneously diabetic Torii rats / Junghyun Kim, Kyuhyung Jo, Chan-Sik Kim, Jin Sook Kim // BMC Complement Altern Med. – 2017. – Vol. 17, № 1. – P. 497. – DOI: 10.1186/s12906-017-1998-3.
108. Autoregenerative redox nanoparticles as an antioxidant and glycation inhibitor for palliation of diabetic cataracts / Yurui Zhou, Lu Li, Shenghui Li [et al.] // Nanoscale. – 2019. – Vol. 11, № 27. – P. 13126-13138. – DOI: 10.1039/c9nr02350.j
109. Barman S. Zinc Supplementation Ameliorates Diabetic Cataract Through Modulation of Crystallin Proteins and Polyol Pathway in Experimental Rats / Susmita Barman, Krishnapura Srinivasan // Biol Trace Elem Res. – 2019. – Vol. 187, № 1. – P. 212-223. – DOI: 10.1007/s12011-018-1373-3.
110. Bejarano E. Too sweet: Problems of protein glycation in the eye / Eloy Bejarano, Allen Taylor // Exp Eye Res. – 2019. – Vol. 178. – P. 255-262. – DOI: 10.1016/j.exer.2018.08.017.
111. Beltramo E. Pericyte loss in diabetic retinopathy: mechanisms and consequences / Elena Beltramo, Massimo Porta // Curr Med Chem. – 2013. – Vol. 20, № 26. – P. 3218-3225. – DOI: 10.2174/09298673113209990022.
112. Beneficial effects of a novel RAGE inhibitor on early diabetic retinopathy and tactile allodynia / Guangyuan Li, Jie Tang, Yunpeng Du [et al.] // Mol Vis. – 2011. – Vol. 17. – P. 3156-3165.

113. Beta-glucogallin reduces the expression of lipopolysaccharide-induced inflammatory markers by inhibition of aldose reductase in murine macrophages and ocular tissues / Kun-Che Chang, Brian Laffin, Jessica Ponder [et al.] // *Chemico-biological interactions*. – 2013. – Vol. 202, № 1-3. – P. 283-287. – DOI: 10.1016/j.cbi.2012.12.001.
114. Biemel K. M. Identification and quantification of major maillard cross-links in human serum albumin and lens protein. Evidence for glucosepane as the dominant compound / Klaus M. Biemel, D. Alexander Friedl, Markus O. Lederer // *J Biol Chem*. – 2002. – Vol. 277, № 28. – P. 24907-24915. – DOI: 10.1074/jbc.M202681200.
115. BIOPAC Systems, Inc. MP150: Hardware Manual. – USA: BIOPAC Systems, [2015]. – URL: <https://www.manualslib.com/manual/1665982/Biopac-Systems-Inc-Mp150.html> (дата обращения: 10.08.2022). – Текст: электронный.
116. Blockade of TGF- β -activated kinase 1 prevents advanced glycation end products-induced inflammatory response in macrophages / Xingxin Xu, Xiangming Qi, Yunxia Shao [et al.] // *Cytokine*. – 2016. – Vol. 78. – P. 62-68. – DOI: 10.1016/j.cyto.2015.11.023.
117. Bonovas S. Diabetes mellitus as a risk factor for primary open-angle glaucoma: a meta-analysis / S. Bonovas, V. Peponis, K. Filioussi // *Diabet Med*. – 2004. – Vol. 21, № 6. – P. 609-614. – DOI: 10.1111/j.1464-5491.2004.01173.x.
118. Capitão M. Angiogenesis and Inflammation Crosstalk in Diabetic Retinopathy / Margarida Capitão, Raquel Soares // *J Cell Biochem*. – 2016. – Vol. 117, № 11. – P. 2443-2453. – DOI: 10.1002/jcb.25575.
119. Catalase, a target of glycation damage in rat liver mitochondria with aging / Hilaire Bakala, Maud Hamelin, Jean Mary [et al.] // *Biochim Biophys Acta*. – 2012. – Vol. 1822, № 10. – P. 1527-1534. – DOI: 10.1016/j.bbadis.2012.05.016.
120. Cataract as Early Ocular Complication in Children and Adolescents with Type 1 Diabetes Mellitus / Marko Šimunović, Martina Paradžik, Roko Škrabić [et al.] // *Int J Endocrinol*. – 2018. – Vol. 2018. – P. 6763586. – DOI: 10.1155/2018/6763586.

121. Cataract in diabetes mellitus / Hasan Kiziltoprak, Kemal Tekin, Merve Inanc, Yasin Sakir Goker // World journal of diabetes. – 2019. – Vol. 10, № 3. – P. 140-153. – DOI: 10.4239/wjd.v10.i3.140.
122. Cataracts and strabismus associated with hand rearing using artificial milk formulas in Bengal tiger (*Panthera tigris* spp *tigris*) cubs / Rogério Ribas Lange, Leandro Lima, Erika Frühvald [et al.] // Open Vet J. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 23-31. – DOI: 10.4314/ovj.v7i1.4.
123. Chalam K. V. Human ciliary epithelium as a source of synthesis and secretion of vascular endothelial growth factor in neovascular glaucoma / Kakarla V Chalam, Vikram S. Brar, Ravi K. Murthy // JAMA Ophthalmol. – 2014. – Vol. 132, № 11. – P. 1350-1354. – DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2014.2356.
124. Characterization of retinal leukostasis and hemodynamics in insulin resistance and diabetes: role of oxidants and protein kinase-C activation / Toru Abiko, Atsuko Abiko, Allen C. Clermont [et al.] // Diabetes. – 2003. – Vol. 52, № 3. – P. 829-837. – DOI: 10.2337/diabetes.52.3.829.
125. Chellan P. Early glycation products produce pentosidine cross-links on native proteins. novel mechanism of pentosidine formation and propagation of glycation / P. Chellan, R. H. Nagaraj // J Biol Chem. – 2001. – Vol. 276, № 6. – P. 3895-3903. – DOI: 10.1074/jbc.M008626200.
126. Chen M. Advanced glycation end products and diabetic retinopathy / M. Chen, T. M. Curtis, A. W. Stitt // Curr Med Chem. – 2013. – Vol. 20, № 26. – P. 3234-3240. – DOI: 10.2174/09298673113209990025.
127. Chronic changes of the iris microvasculature of streptozotocin-induced diabetic rats using fluorescence videomicroscopy/ Amporn Jariyapongskul, Tippawan Rungjaroen, Ngamjit Kasetsuwan [et al.] // Clin Hemorheol Microcirc. – 2006. – Vol. 34, № 1-2. – P. 283-293.
128. Citrus hystrix leaf extract attenuated diabetic-cataract in STZ-rats / Nor Shahira Solehah Umran, Suhaila Mohamed, Seng Fong Lau, Nur Iliyani Mohd Ishak // J Food Biochem. – 2020. – Vol. 44, № 8. – P. e13258. – DOI: 10.1111/jfbc.13258.

129. Ciulla T. A. Visual acuity outcomes and anti-VEGF therapy intensity in diabetic macular oedema: a real-world analysis of 28 658 patient eyes / Thomas A. Ciulla, John S. Pollack, David F. Williams // *Br J Ophthalmol*. – 2021. – Vol. 105, № 2. – P. 216-221. – DOI: 10.1136/bjophthalmol-2020-315933.
130. Clinical efficacy of intravitreal aflibercept versus panretinal photocoagulation for best corrected visual acuity in patients with proliferative diabetic retinopathy at 52 weeks (CLARITY. – P. a multicentre, single-blinded, randomised, controlled, phase 2b, non-inferiority trial / Sobha Sivaprasad, A. Toby Prevost, Joana C. Vasconcelos [et al.] // *Lancet*. – 2017. – Vol. 389, № 10085. – P. 2193-2203. – DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31193-5.
131. Comparison of glycation of glutathione S-transferase by methylglyoxal, glucose or fructose / Iva Boušová, Zuzana Průchová, Lucie Trnková, Jaroslav Dršata // *Mol Cell Biochem*. – 2011. – Vol. 357, № 1-2. – P. 323-330. – DOI: 10.1007/s11010-011-0903-5.
132. Connective tissue growth factor increased by hypoxia may initiate angiogenesis in collaboration with matrix metalloproteinases / Seiji Kondo, Satoshi Kubota, Tsuyoshi Shimo [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2002. – Vol. 23, № 5. – P. 769-776.
133. Constitutive expression of VEGF, VEGFR-1, and VEGFR-2 in normal eyes / Ivana Kim; Anne M. Ryan; Richard Rohan [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 1999. – Vol. 40, № 9. – P. 2115-2121. Erratum in: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;4(2):368.
134. Corneal stiffness and collagen cross-linking proteins in glaucoma: potential for novel therapeutic strategy / Najiha Rahman, Evelyn O'Neill, Mustapha Irnaten [et al.] // *J Ocul Pharmacol Ther*. – 2020. – Vol. 36, № 8. – P. 582-594. – DOI: 10.1089/jop.2019.0118.
135. Correction of erythrocyte deformability defect in ALX-induced diabetic rabbits after treatment with aminoguanidine / Clinton D. Brown, Zhong H. Zhao, Fernando De Alvaro [et al.] // *Diabetes*. – 1993. – Vol. 42, № 4. – P. 590-593. – DOI: 10.2337/diab.42.4.590.

136. Curcumin and turmeric delay streptozotocin-induced diabetic cataract in rats / Palla Suryanarayana, Megha Saraswat, Tiruvalluru Mrudula [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2005. – Vol. 46, № 6. – P. 2092-2099. – DOI: 10.1167/iovs.04-1304.
137. Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice / Pamela M. Martin, Penny Roon, Tracy K. Van Ells [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2004. – Vol. 45, № 9. – P. 3330-3336. – DOI: 10.1167/iovs.04-0247.
138. Diabetes, fasting glucose, and the risk of glaucoma: a meta-analysis / Di Zhao, Juhee Cho, Myung Hun Kim [et al.] // *Ophthalmology.* – 2015. – Vol. 122, № 1. – P. 72-78. – DOI: 10.1016/j.ophtla.2014.07.051.
139. Diabetic retinopathy, superoxide damage and antioxidants / Julia M. Santos, Ghulam Mohammad, Qing Zhong, Renu A. Kowluru // *Curr Pharm Biotechnol.* – 2011. – Vol. 12, № 3. – P. 352-361. – DOI: 10.2174/138920111794480507.
140. Dietary ages and their role in health and disease / ed. J. Uribarri. – 1st ed. – UK: CRC Press, 2017. – 400 p. – ISBN 9781315120041. – DOI: 10.1201/9781315120041.
141. Dietary flavonoids inhibit the glycation of lens proteins: Implications in the management of diabetic cataract / Kapil K. Patil, Rohan J. Meshram, Sagar H. Barage, Rajesh N. Gacche // *3 Biotech.* – 2019. – Vol. 9, № 2. – P. 47. – DOI: 10.1007/s13205-019-1581-3.
142. Differential proteomic analyses of cataracts from rat models of type 1 and 2 diabetes / Sheng Su, Fei Leng, Linan Guan [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2014. – Vol. 55, № 12. – P. 7848-7861. – DOI: 10.1167/iovs.14-15175.
143. Dissociation of HKII in retinal epithelial cells induces oxidative stress injury in the retina / Liqun Chu, Lin Xiao, Bing Xu, Jingmei Xu // *Int J Mol Med.* – 2019. – Vol. 44, № 4. – P. 1377-1387. – DOI: 10.3892/ijmm.2019.4304.
144. Drinkwater J. J. A systematic review of risk factors for cataract in type 2 diabetes / Jocelyn J. Drinkwater, Wendy A. Davis, Timothy M. E. Davis // *Diabetes Metab Res Rev.* – 2019. – Vol. 35, № 1. – P. e3073. – DOI: 10.1002/dmrr.3073.

145. During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium / R. J. Melder, G. C. Koenig, B. P. Witwer [et al.] // *Nat Med.* – 1996. – Vol. 2, № 9. – P. 992-997. – DOI: 10.1038/nm0996-992.
146. Ebselen by modulating oxidative stress improves hypoxia-induced macroglial Müller cell and vascular injury in the retina / Sih Min Tan, Devy Deliyanti, William A. Figgett [et al.] // *Exp Eye Res.* – 2015. – Vol. 136. – P. 1-8. – DOI: 10.1016/j.exer.2015.04.015.
147. Effect of 'catalin' an anticataract agent on alloxan induced hyperglycaemia and diabetic cataract in rats / P. M. Bulakh, A. G. Chandorkar, J. J. Balsara [et al.] // *Indian J Ophthalmol.* – 1980. – Vol. 28, № 1. – P. 1-3.
148. Effect of caffeine on biomarkers of oxidative stress in lenses of rats with streptozotocin-induced diabetes / Ilona Kaczmarczyk-Sedlak, Joanna Folwarczna, Lech Sedlak [et al.] // *Arch Med Sci.* – 2019. – Vol. 15, № 4. – P. 1073-1080. – DOI: 10.5114/aoms.2019.85461.
149. Effect of carbonyl compounds on red blood cells deformability / Hiroyoshi Iwata, Hiroyuki Ukeda, Tohru Maruyama [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2004. – Vol. 321, № 3. – P. 700-706. – DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.07.026.
150. Effect of carnosine, aminoguanidine, and aspirin drops on the prevention of cataracts in diabetic rats / Hong Yan, Yong Guo, Jie Zhang [et al.] // *Mol Vis.* – 2008. – Vol. 14. – P. 2282-2291.
151. Effect of dicarbonyl-induced browning on alpha-crystallin chaperone-like activity: Physiological significance and caveats of in vitro aggregation assays / M. Satish Kumar, P. Yadagiri Reddy, P. Anil Kumar [et al.] // *Biochem J.* – 2004. – Vol. 379, № Pt 2. – P. 273-282. – DOI: 10.1042/BJ20031633.
152. Effects of erythropoietin and aminoguanidine on red blood cell deformability in diabetic azotemic and uremic patients / Clinton D. Brown, Zhong H. Zhao, Lorraine L. Thomas [et al.] // *Am J Kidney Dis.* – 2001. – Vol. 38, № 6. – P. 1414-1420. – DOI: 10.1053/ajkd.2001.29281.

153. Effects of nitric oxide synthase inhibitor on intraocular pressure and ocular inflammation following laser irradiation in rabbits / Toru Taniguchi, Hideaki Kawakami, Akira Sawada [et al.] // *Curr Eye Res.* – 1998. – Vol. 17, № 3. – P. 308-315. – DOI: 10.1076/ceyr.17.3.308.5225.
154. Electroretinographic evidence suggesting that the type 2 diabetic retinopathy of the sand rat *Psammomys obesus* is comparable to that of humans / Ahmed Dellaa, Maha Benlarbi, Imane Hammoum [et al.] // *PLoS One.* – 2018. – Vol. 13, № 2. – P. e0192400. – DOI: 10.1371/journal.pone.0192400.
155. Endothelial cell hypertrophy induced by vascular endothelial growth factor in the retina: new insights into the pathogenesis of capillary nonperfusion / Pim Hofman, Bart C. van Blijswijk, Pieter J. Gaillard [et al.] // *Arch. Ophthalmol.* – 2001. – Vol. 119, № 6. – P. 861-866.
156. Endothelial dysfunction in diabetic retinopathy / Fu Gui, Zhipeng You, Shuhua Fu [et al.] // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2020. – Vol. 11. – P. 591. – DOI: 10.3389/fendo.2020.00591.
157. Engelen L. Current therapeutic interventions in the glycation pathway: evidence from clinical studies / L. Engelen, C. D. A. Stehouwer, C. G. Schalkwijk // *Diab. Obes. Metab.* – 2013. – Vol. 15, № 8. – P. 677- 689.
158. Enhanced degradation and decreased stability of eye lens alpha-crystallin upon methylglyoxal modification / M. Satish Kumar, T. Mrudula, N. Mitra, G. Bhanuprakash Reddy // *Exp Eye Res.* – 2004. – Vol. 79, № 4. – P. 577-583. – DOI: 10.1016/j.exer.2004.07.003.
159. Erratum. Risk of Severe Hypoglycemia in Type 1 Diabetes Over 30 Years of Follow-up in the DCCT/EDIC Study. *Diabetes Care* 2017; 40:1010-1016 / Rose A. Gubitosi-Klug, Barbara H. Braffett, Neil H. White [et al.] // *Diabetes Care.* – 2021. – Vol. 44, № 1. – P. 298.
160. Evaluation of intravitreal aflibercept for the treatment of severe nonproliferative diabetic retinopathy: results from the PANORAMA randomized clinical trial / David M. Brown, Charles C. Wykoff, David Boyer [et al.] // *JAMA Ophthalmol.* – 2021. – Vol. 139, № 9. – P. 946-955. – DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2021.2809.

161. Evaluation of some oxidative markers in diabetes and diabetic retinopathy / Hadeel Ahmed Shawki, Rasha Elzehery, Maha Shahin [et al.] // *Diabetology International*. – 2020. – Vol. 12, № 1. – P. 108-117. – DOI: 10.1007/s13340-020-00450-w.
162. Evaluation of vitreous levels of advanced glycation end products and angiogenic factors as biomarkers for severity of diabetic retinopathy / Makiko Katagiri, Jun Shoji, Noriko Inada [et al.] // *Int Ophthalmol*. – 2018. – Vol. 38, № 2. – P. 607-615. – DOI: 10.1007/s10792-017-0499-1.
163. Experimental scleral cross-linking increases glaucoma damage in a mouse model / Elizabeth C. Kimball, Cathy Nguyen, Matthew R. Steinhart [et al.] // *Exp Eye Res*. – 2014. – Vol. 128. – P. 129-140. – DOI: 10.1016/j.exer.2014.08.016.
164. Extracellular matrix is modulated in advanced glycation end products milieu via a RAGE receptor dependent pathway boosted by transforming growth factor- β 1 RAGE / Andreea Iren Serban, Loredana Stanca, Ovidiu Ionut Geicu [et al.] // *J Diabetes*. – 2015. – Vol. 7, № 1. – P. 114-124. – DOI: 10.1111/1753-0407.12154.
165. Falavarjani K. G. Adverse events and complications associated with intravitreal injection of anti-VEGF agents: a review of literature / K Ghasemi Falavarjani, Q. D. Nguyen // *Eye (Lond)*. – 2013. – Vol. 27, № 7. – P. 787-794. – DOI: 10.1038/eye.2013.107.
166. Fan L. FTY720 Attenuates Retinal Inflammation and Protects Blood-Retinal Barrier in Diabetic Rats / Lingling Fan, Hua Yan // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2016. – Vol. 57, № 3. – P. 1254-63. – DOI: 10.1167/iovs.15-18658.
167. Fan X. Protein posttranslational modification (PTM) by glycation: Role in lens aging and age-related cataractogenesis / Xingjun Fan, Vincent M. Monnier // *Exp Eye Res*. – 2021. – Vol. 210. – P. 108705. – DOI: 10.1016/j.exer.2021.108705.
168. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress / Napoleone Ferrara // *Endocr Rev*. – 2004. – Vol. 25, № 4. – P. 581-611. – DOI: 10.1210/er.2003-0027.
169. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid / John R, Latendresse, Alan

- R. Warbritton, Henning Jonassen, Dianne M Creasy // *Toxicol Pathol.* – 2002. – Vol. 30, № 4. – P. 524-533. – DOI:10.1080/01926230290105721.
170. Fuchshofer R. The role of TGF- β in the pathogenesis of primary open-angle glaucoma / Rudolf Fuchshofer, Ernst R. Tamm // *Cell Tissue Res.* – 2012. – Vol. 347, № 1. – P. 279-290. – DOI: 10.1007/s00441-011-1274-7.
 171. Fuentealba D. Advanced glycation endproducts induce photocrosslinking and oxidation of bovine lens proteins through type-I mechanism / Denis Fuentealba, Bertrand Friguet, Eduardo Silva // *Photochem Photobiol.* – 2009. – Vol. 85, № 1. – P. 185-194. – DOI: 10.1111/j.1751-1097.2008.00415.x.
 172. Ganglion cells apoptosis in diabetic rats as early prediction of glaucoma: a study of Brn3b gene expression and association with change of quantity of NO, caspase-3, NF- κ B, and TNF- α / Irwan Tjandra, Purnomo Soeharso, Widya Artini [et al.] // *Int J Ophthalmol.* – 2020. – Vol. 13, № 12. – P. 1872-1879. – DOI: 10.18240/ijo.2020.12.05.
 173. Gao S. Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy as an Alternative or Adjunct to Pan-Retinal Photocoagulation in Treating Proliferative Diabetic Retinopathy: Meta-Analysis of Randomized Trials / Shuang Gao, Zhongjing Lin, Xi Shen // *Front Pharmacol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 849. – DOI: 10.3389/fphar.2020.00849.
 174. Garcia Soriano F. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation / Francisco Garcia Soriano, László Virág, Prakash Jagtap [et al.] // *Nat Med* 2001. – Vol. 7, № 1. – P. 108-113.
 175. Gavard J. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin / Julie Gavard, J. Silvio Gutkind // *Nat Cell Biol.* – 2006. – Vol. 8, № 11. – P. 1223-1234. – DOI: 10.1038/ncb1486.
 176. Ghosh K. S. Crystallins and Their Complexes / Kalyan Sundar Ghosh, Priyanka Chauhan // *Subcell Biochem.* – 2019. – Vol. 93. – P. 439-460. – DOI: 10.1007/978-3-030-28151-9_14.

177. Gimbrone M. A. Biomechanical activation: an emergin paradigm in endothelial adhesion biology / M. A. Gimbrone Jr, T. Nagel, J. N. Topper // J Clin Invest. – 1997. – Vol. 99, № 8. – P. 1809-1813.
178. Glaucomatous outflow pathway and oxidative stress / Sergio Claudio Saccà, Alberto Izzotti, Pietro Rossi, Carlo Traverso // Exp Eye Res. – 2007. – Vol. 84, № 3. – P. 389-399. – DOI: 10.1016/j.exer.2006.10.008.
179. Glial cell-derived cytokines attenuate the breakdown of vascular integrity in diabetic / Nami Nishikiori, Makoto Osanai, Hideki Chiba [et al.] // Diabetes. – 2007. – Vol. 56, № 5. – P. 1333-1340.
180. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy / Joanne W. Y. Yau, Sophie L. Rogers, Ryo Kawasaki [et al.] // Diabetes Care. – 2012. – Vol. 35, № 3. – P. 556-564.
181. Glycated proteome: from reaction to intervention / Mahesh J. Kulkarni, Arvind M. Korwar, Sheon Mary [et al.] // Proteomics Clin.Appl. – 2013. – Vol. 7. – P. 155-170.
182. Glycation-induced inactivation of NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase: implications for diabetes and aging / In Sup Kil, Jin Hyup Lee, Ai Hyang Shin, Jeen-Woo Park // Free Radic Biol Med. – 2004. – Vol. 37, № 11. – P. 1765-1778. – DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.025.
183. Glycation, oxidative stress, and scavenger activity: Glucose metabolism and radical scavenger dysfunction in endothelial cells / Atunori Kashiwagi, Takayuki Asahina, Yoshihiko Nishio [et al.] // Diabetes. – 1996. – Vol. 45, № Suppl 3. – P. S84-S86.
184. Gouda M. A. Synthesis and antioxidant evaluation of some new pyridopyrazolotriazine derivatives / Moustafa A. Gouda // J. Heterocyclic Chem. – 2014. – Vol. № 1. – P. 1-10.
185. Hansen S. H. The role of taurine in diabetes and the development of diabetic complications / S H Hansen // Diabetes Me tab Res Rev. – 2001. – Vol. 17, № 5. – P. 330-346. – DOI: 10.1002/dmrr.229.

186. Heath M. M. Glycation-induced inactivation of malate dehydrogenase protection by aspirin and a lens molecular chaperone, alpha-crystallin / Melanie M. Heath, Kenneth C. Rixon, John J. Harding // *Biochim Biophys Acta*. – 1996. – Vol. 1315, № 3. – P. 176-184. – DOI: 10.1016/0925-4439(95)00120-4.
187. High glucose disrupts mitochondrial morphology in retinal endothelial cells: Implications for diabetic retinopathy / Kyle Trudeau, Anthony J. A. Molina, Wen Guo, Sayon Roy // *Am. J. Pathol.* – 2010. – Vol. 177. – P. 447-455. – DOI: 10.2353/ajpath.2010.091029.
188. High glucose induced endothelial cell reactive oxygen species via OGG1/PKC/NADPH oxidase pathway / Xiangrong Xie, Yan Chen, Jichun Liu [et al.] // *Life Sci.* – 2020. – Vol. 256. – P. 117886. – DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117886.
189. High glucose induces mitochondrial dysfunction in retinal muller cells: implications for diabetic retinopathy / Thomas Tien, Joyce Zhang, Tetsuya Muto [et al.] // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2017. – Vol. 58. – P. 2915-2921. – DOI: 10.1167/iovs.16-21355.
190. High risk of early cataracts in young type 1 diabetes group: a nationwide cohort study / Wen-Li Lu, Po-Chih Shen, Chen-Hao Lee [et al.] // *Int J Endocrinol.* – 2020. – Vol. 2020. – P. 8160256. – DOI:10.1155/2020/8160256.
191. Horwitz J. Alpha-crystallin / Joseph Horwitz // *Exp. Eye Res.* – 2003. – Vol. 76. – P. 145-153. – DOI: 10.1016/S0014-4835(02)00278-6.
192. How Does Pyridoxamine Inhibit the Formation of Advanced Glycation End Products? The Role of Its Primary Antioxidant Activity / Rafael Ramis, Joaquín Ortega-Castro, Carmen Caballero [et al.] // *Antioxidants (Basel)*. – 2019. – Vol. 8, № 9. – P. 344. – DOI: 10.3390/antiox8090344.
193. Hyperglycaemia-induced pro-inflammatory responses by retinal Müller glia are regulated by the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) / H. Zong, M. Ward, A Madden [et al.] // *Diabetologia*. – 2010. – Vol. 53, № 12. – P. 2656-2666. – DOI: 10.1007/s00125-010-1900-z.

194. Hyperglycemia-induced VEGF and ROS production in retinal cells is inhibited by the mTOR inhibitor, rapamycin / Teruyo Kida, Hidehiro Oku, Sho Osuka [et al.] // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 1885.
195. IDF Diabetes Atlas / International Diabetes Federation. – 10th Edition. – Brussels: International Diabetes Federation, 2021. – URL: https://diabetesatlas.org/idfawp/resource-files/2021/07/IDF_Atlas_10th_Edition_2021.pdf (дата обращения: 10.08.2022). – Текст: электронный.
196. IL-17A injury to retinal ganglion cells is mediated by retinal Müller cells in diabetic retinopathy / Ao-Wang Qiu, Da-Rui Huang, Bin Li [et al.] // Cell Death Dis. – 2021. – Vol. 12, № 11. – P. 1057. – DOI: 10.1038/s41419-021-04350-y.
197. Immunochemical detection of advanced glycation end products in lens crystallins from streptozocin-induced diabetic rat / Hidetaka Nakayama, Tomoko Mitsuhashi, Satoru Kuwajima [et al.] // Diabetes. – 1993. – Vol. 42, № 2. – P. 345-350. – DOI: 10.2337/diab.42.2.345.
198. Impaired deformability and association with density distribution of erythrocytes in patients with type 2 diabetes mellitus under treatment / Takeshi Arita, Toru Maruyama, Taku Yokoyama [et al.] // Clin Hemorheol Microcirc. – 2020. – Vol. 76, № 1. – P. 73-83. – DOI: 10.3233/CH-200873.
199. Improved survival and retinal function of aging ZDF rats in long-term, uncontrolled diabetes by BGP-15 treatment / Zita Wachal, Anna Szilágyi, Barbara Takács [et al.] // Front Pharmacol. – 2021. – Vol. 16, № 12. – P. 650207. – DOI: 10.3389/fphar.2021.650207.
200. Improvement in Diabetic Retinopathy through Protection against Retinal Apoptosis in Spontaneously Diabetic Torii Rats Mediated by Ethanol Extract of *Osteomeles schwerinae* C.K. Schneid / Chan-Sik Kim, Junghyun Kim, Young Sook Kim [et al.] // Nutrients. – 2019. – Vol. 1, № 3. – P. 546. – DOI: 10.3390/nu11030546.

201. Increased level of vascular endothelial growth factor in aqueous humor of patients with neovascular glaucoma / Ramesh C. Tripathi, Junping Lixa, Brenda J. Tripathi [et al.] // *Ophthalmology*. – 1998. – Vol. 105, № 2. – P. 232-237.
202. Increased levels of advanced glycation end products in human cataractous lenses / Sybille Franke, Jens Dawczynski, Jürgen Strobel [et al.] // *J Cataract Refract Surg*. – 2003. – Vol. 29, № 5. – P. 998-1004. – DOI: 10.1016/s0886-3350(02)01841-2.
203. Increased levels of vascular endothelial growth factor and advanced glycation end products in aqueous humor of patients with diabetic retinopathy / M. Endo, K. Yanagisawa, K. Tsuchida [et al.] // *Horm Metab Res*. – 2001. – Vol. 33, № 5. – P. 317-322. – DOI: 10.1055/s-2001-15122.
204. Increased risk of open-angle glaucoma among patients with diabetes mellitus: a 10-year follow-up nationwide cohort study / Tyler Hyungtaek Rim, Sang Yeop Lee, Hyoungh Won Bae [et al.] // *Acta Ophthalmol*. – 2018. – Vol. 96, № 8. – P. e1025-e1030. – DOI: 10.1111/aos.13805.
205. lncRNA TGF β 2-AS1 promotes ECM production via TGF- β 2 in human trabecular meshwork cells / Yingjuan Lv, Zhanheng Zhang, Xiaoli Xing, Aihua Liu // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2020. – Vol. 527, № 4. – P. 881-888. – DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.05.003.
206. Inducible nitric oxide synthase isoform is a key mediator of leukostasis and blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy / Ermelindo C. Leal, Ayyakkannu Manivannan, Ken-Ichi Hosoya [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2007. – Vol. 48, № 11. – P. 5257-5265. – DOI: 10.1167/iovs.07-0112.
207. Inhibition of Atypical Protein Kinase C Reduces Inflammation-Induced Retinal Vascular Permeability // Cheng-Mao Lin, Paul M. Titchenell, Jason M. Keil [et al.] // *Am J Pathol*. – 2018. – Vol. 188, № 10. – P. 2392-2405. – DOI: 10.1016/j.ajpath.2018.06.020.
208. Inhibition of diabetic leukostasis and blood-retinal barrier breakdown with a soluble form of a receptor for advanced glycation end products / Yuichi Kaji, Tomohiko Usui, Susumu Ishida [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2007. – Vol. 48, № 2. – P. 858-865. – DOI: 10.1167/iovs.06-0495.

209. Inhibition of protein kinase C delta attenuates blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy / Jeong-Hun Kim, Jin Hyoung Kim, Hyoung-Oh Jun [et al.] // *Am J Pathol.* – 2010. – Vol. 176, № 3. – P. 1517-1524. – DOI: 10.2353/ajpath.2010.090398.
210. Inhibitory effect of crocin(s) on lens α -crystallin glycation and aggregation, results in the decrease of the risk of diabetic cataract / Fereshteh Bahmani, Seyedeh Zahra Bathaie, Seyed Javid Aldavood, Arezou Ghahghaei // *Molecules.* – 2016. – Vol. 21, № 2. – P. 143. – DOI: 10.3390/molecules21020143.
211. Integrin-mediated neutrophil adhesion and retinal leukostasis in diabetes / Fina Cañas Barouch, Kazuaki Miyamoto, Jennifer R. Allport [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2000. – Vol. 41. – P. 1153-1158.
212. Interaction between NADPH-oxidase and Rho-kinase in angiotensin II-induced microglial activation / Ana I. Rodriguez-Perez, Ana Borrajo, Jannette Rodriguez-Pallares [et al.] // *Glia.* – 2015. – Vol. 63, № 3. – P. 466-482. – DOI: 10.1002/glia.22765.
213. Intravitreal anti-vascular endothelial growth factors, panretinal photocoagulation and combined treatment for proliferative diabetic retinopathy: a systematic review and network meta-analysis / Matteo Fallico, Andrea Maugeri, Andrew Lotery [et al.] // *Acta Ophthalmol.* – 2021. – Vol. 99, № 6. – P. e795-e805. – DOI: 10.1111/aos.14681.
214. Intravitreal neovascular tissue of proliferative diabetic retinopathy: an immunohistochemical study / Y. Hosoda, M. Okada, M. Matsumura [et al.] // *Ophthalmic Res.* – 1992. – Vol. 24, № 5. – P. 260-264. – DOI: 10.1159/000267176.
215. Intravitreal VEGF and bFGF produce florid retinal neovascularization and hemorrhage in the rabbit / C. G. Wong, K. A. Rich, Lih-Huei L. Liaw [et al.] // *Curr. Eye. Res.* – 2001. – Vol. 22, № 2. – P. 140-147.
216. Involvement of advanced glycation end products in the pathogenesis of diabetic retinopathy / Jing Xu, Lin-Jiang Chen, Jian Yu [et al.] // *Cellular Physiology and Biochemistry.* – 2018. – Vol. 48, № 2. – P. 705-717.

217. Is diabetes mellitus a risk factor for open-angle glaucoma? The Rotterdam Study / Simone de Voogd, M. Kamran Ikram, Roger C. W. Wolfs [et al.] // *Ophthalmology*. – 2006. – Vol. 113, № 10. – P. 1827-1831. – DOI: 10.1016/j.ophtla.2006.03.063.
218. Is leukostasis a crucial step or epiphenomenon in the pathogenesis of diabetic retinopathy? / Anne-Eva van der Wijk, John M Hughes, Ingeborg Klaassen [et al.] // *J Leukoc Biol*. – 2017. – Vol. 102, № 4. – P. 993-1001. – DOI: 10.1189/jlb.3RU0417-139.
219. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents / Maria E. Craig, Craig Jefferies, Dana Dabelea [et al.] // *Pediatr Diabetes*. – 2014. – Vol. 15, № Suppl 20. – P. 4-17. – DOI: 10.1111/pedi.12186.
220. Jacquin-Becker C. Regulation of aldose reductase expression in rat astrocytes in culture / C. Jacquin-Becker, G. Labourdette // *Glia*. – 1997. – Vol. 20, № 2. – P. 135-144. – DOI: 10.1002/(sici)1098-1136(199706)20:2<135::aid-glia5>3.0.co;2-8.
221. Jedsadayanmata A. In vitro antiglycation activity of arbutin / Arom Jedsadayanmata // *Naresuan University Journal*. – 2005. – Vol. 13, № 2. – P. 35-41.
222. Ji L. Diosgenin, a Novel Aldose Reductase Inhibitor, Attenuates the Galactosemic Cataract in Rats / Lixia Ji, Lixia Cheng, Zhihong Yang // *Journal of diabetes research*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 7309816. – DOI: 10.1155/2017/7309816.
223. Jung K. I. Intraocular pressure fluctuation and neurodegeneration in the diabetic rat retina / Kyoung In Jung, Jung Eun Woo, Chan Kee Park // *Br J Pharmacol*. – 2020. – Vol. 177, № 13. – P. 3046-3059. – DOI: 10.1111/bph.15033.
224. Kaiser P. K. Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular diseases / Peter K Kaiser // *Am J Ophthalmol*. – 2006. – Vol. 142, № 4. – P. 660-668. – DOI: 10.1016/j.ajo.2006.05.061.

225. Karumanchi D. K. Early diagnosis of diabetes through the eye / Devi Kalyan Karumanchi, Elizabeth R. Gaillard, James Dillon // *Photochem Photobiol.* – 2015. – Vol. 91, № 6. – P. 1497-1504. – DOI: 10.1111/php.12524.
226. Kern T. S. Pharmacological inhibition of diabetic retinopathy: aminoguanidine and aspirin / Timothy S. Kern, Ronald L. Engerman // *Diabetes.* – 2001 Jul. – Vol. 50, № 7. – P. 1636-1642. – DOI: 10.2337/diabetes.50.7.1636.
227. Kianpour M. carnosine prevents different structural damages induced by methylglyoxal in lens crystallins / Maryam Kianpour 1, Reza Yousefi // *Cell Biochem Biophys.* – 2019. – Vol. 77, № 4. – P. 343-355. – DOI: 10.1007/s12013-019-00884-3.
228. Kim S. I. Prevalence and risk factors for cataracts in persons with type 2 diabetes mellitus / Seong Il Kim, Sung Jin Kim // *Korean J Ophthalmol.* – 2006. – Vol. 20, № 4. – P. 201-204. – DOI: 10.3341/kjo.2006.20.4.201.
229. Kowluru R. A. Matrix metalloproteinases in diabetic retinopathy: potential role of MMP-9 / Renu A. Kowluru, Qing Zhong, Julia M. Santos // *Expert Opin Investig Drugs.* – 2012. – Vol. 21, № 6. – P. 797-805. – DOI: 10.1517/13543784.2012.681043.
230. Krick T. W. Recent clinically relevant highlights from the Diabetic Retinopathy Clinical Research Network / Tracy W. Krick, Neil M. Bressler // *Curr Opin Ophthalmol.* – 2018. – Vol. 29, № 3. – P. 199-205. – DOI: 10.1097/ICU.0000000000000472.
231. Kumar P. A. Effect of glycation on alpha-crystallin structure and chaperone-like function / P. Anil Kumar, M. Satish Kumar, G. Bhanuprakash Reddy // *Biochem J.* – 2007. – Vol. 408, № 2. – P. 251-258. – DOI: 10.1042/BJ20070989.
232. Larsson L. I. Aqueous humor dynamics in patients with diabetes mellitus / Lill-Inger Larsson, John M. Pach, Richard F. Brubaker // *Am J Ophthalmol.* – 1995. – Vol. 120, № 3. – P. 362-367. – DOI: 10.1016/s0002-9394(14)72166-x.
233. Lens epithelial cell apoptosis initiates diabetic cataractogenesis in the Zucker diabetic fatty rat / Junghyun Kim, Chan-Sik Kim, Eunjin Sohn [et al.] // *Graefes*

- Arch Clin Exp Ophthalmol. – 2010. – Vol. 248, № 6. – P. 811-818. – DOI: 10.1007/s00417-010-1313-1.
234. Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina / A. M. Jousen, T. Murata, A. Tsujikawa // Am J Pathol. – 2001. – Vol. 158, № 1. – P. 147-152. – DOI:10.1016/S0002-9440(10)63952-1.
 235. Liang J. J. Conformational study of N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of recombinant gammaC-crystallin / J. J. Liang, L. Fu // J Protein Chem. – 2001. – Vol. 20, № 8. – P. 641-645. – DOI: 10.1023/a:1013768319488.
 236. Litsea japonica extract inhibits neuronal apoptosis and the accumulation of advanced glycation end products in the diabetic mouse retina / Junghyun Kim, Chan-Sik Kim, Yun Mi Lee [et al.] // Mol Med Rep. – 2015. – Vol. 12, № 1. – P. 1075-1081. – DOI: 10.3892/mmr.2015.3543.
 237. Liu H. Effect of probucol on hemodynamics, rheology and blood lipid of diabetic retinopathy / Hong Liu, Mingming Cai // Exp Ther Med. – 2018. – Vol. 15, № 4. – P. 3809-3814. – DOI: 10.3892/etm.2018.5917.
 238. Long A. C. Regulation of gap junction intercellular communication in primary canine lens epithelial cells: role of protein kinase C / Amy C. Long, Carmen M. H. Colitz, Joshua A. Bomser // Curr Eye Res. – 2007. – Vol. 32, № 3. – P. 223-231. – DOI: 10.1080/02713680601186714.
 239. Long term features of diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats / Asieh Naderi, Reza Zahed, Leila Aghajanzpour [et al.] // Exp Eye Res. – 2019. – Vol. 184. – P. 213-220. – DOI: 10.1016/j.exer.2019.04.025.
 240. Long-term effects of oral vitamin C supplementation on the endothelial dysfunction in the iris microvessels of diabetic rats / Amporn Jariyapongskul, Tippawan Rungjaroen, Ngamjit Kasetsuwan [et al.] // Microvasc Res. – 2007. – Vol. 74, № 1. – P. 32-38. – DOI: 10.1016/j.mvr.2007.03.002.
 241. Long-term global retinal microvascular changes in a transgenic vascular endothelial growth factor mouse model / W-Y. Shen, C. M. Lai, C. E. Graham [et al.] // Diabetologia. – 2006. – Vol. 49, № 7. – P. 1690-1701. – DOI: 10.1007/s00125-006-0274-8.

242. Long-term treatment with fidarestat suppresses the development of diabetic retinopathy in STZ-induced diabetic rats / Noriaki Kato, Satomi Yashima, Takeshi Suzuki [et al.] // *Journal of diabetes and its complications*. – 2003. – Vol. 17, № 6. – P. 374-379. – DOI: 10.1016/s1056-8727(02)00193-9.
243. Lorenzi M. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient / Mara Lorenzi // *Exp Diabetes Res*. – 2007. – Vol. 2007. – P. 61038. – DOI: 10.1155/2007/61038.
244. Loss of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in patients with diabetic retinopathy / Elisabeth Anne Obara, Jens Hannibal, Steffen Heegaard, Jan Fahrenkrug // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2017. – Vol. 58, № 4. – P. 2187-2192. – DOI: 10.1167/iovs.16-21168.
245. Luo D. The effects of aminoguanidine on retinopathy in STZ-induced diabetic rats / Dawei Luo, Ying Fan, Xun Xu // *Bioorg Med Chem Lett*. – 2012. – Vol. 22, № 13. – P. 4386-4390. – DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.04.130.
246. Luthra M. Nonenzymatic glycation alters protein structure and stability. A study of two eye lens crystallins / Manni Luthra, Dorairajan Balasubramanian // *J Biol Chem*. – 1993. – Vol. 268, № 24. – P. 18119-18127.
247. Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus / D. R. McCance, D. G. Dyer, J. A. Dunn [et al.] // *J Clin Invest*. – 1993. – Vol. 91, № 6. – P. 2470-2478. – DOI: 10.1172/JCI116482.
248. Malone J. I. Taurine prevents galactose-induced cataracts / John I. Malone, Steve A. Benford, John Malone Jr. // *J Diabetes Complications*. – 1993. – Vol. 7, № 1. – P. 44-48. – DOI: 10.1016/1056-8727(93)90023-r.
249. Mantych G. J. Characterization of glucose transporter isoforms in the adult and developing human eye / G. J. Mantych, G. S. Hageman, S. U. Devaskar // *Endocrinology*. – 1993. – Vol. 133, № 2. – P. 600-607. – DOI: 10.1210/endo.133.2.8344201.
250. Martinez M. Lipids of the developing human retina: I. Total fatty acids, plasmalogens, and fatty acid composition of ethanolamine and choline

- phosphoglycerides / M. Martinez, A. Ballabriga, J. J. Gil-Gibernau [et al.] // J Neurosci Re. – 1988. – Vol. 20. – P. 484-490. – DOI: 10.1002/jnr.490200412.
251. McNulty M. Advanced glycation end-products and arterial stiffness in hypertension / Marie McNulty, Azra Mahmud, John Feely // Am J Hypertens. – 2007. – Vol. 20, № 3. – P. 242-247. – DOI: 10.1016/j.amjhyper.2006.08.009.
 252. Measurement of corneal biomechanical properties in diabetes mellitus using the ocular response analyzer and the Corvis ST / Lisa Ramm, Robert Herber, Eberhard Spoerl [et al.] // Cornea. – 2019. – Vol. 38, № 5. – P. 595-599. – DOI: 10.1097/ICO.0000000000001879.
 253. Melatonin Reduces Cataract Formation and Aldose Reductase Activity in Lenses of Streptozotocin-induced Diabetic Rat / Marjan Khorsand, Masoumeh Akmal, Sahab Sharzad, Mojtaba Beheshtitabar // Iran J Med Sci. – 2016. – Vol. 41, № 4. – P. 305-313.
 254. Metabolism of fructose-3-phosphate in the diabetic rat lens / S. Lal, B. S. Szwergold, A. H. Taylor [et al.] // Archives of biochemistry and biophysics. – 1995. – Vol. 318, № 1. – P. 191-199. – DOI: 10.1006/abbi.1995.1220.
 255. Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats / Cristina M. Sena, Paulo Matafome, Teresa Louro [et al.] // Br J Pharmacol. – 2011. – Vol. 163, № 2. – P. 424-437.
 256. Mishra A. Aminoguanidine reverses the loss of functional hyperemia in a rat model of diabetic retinopathy / Anusha Mishra, Eric A. Newman // Front Neuroenergetics. – 2012. – Vol. 3. – P. 10. – DOI: 10.3389/fnene.2011.00010.
 257. Modelling cortical cataractogenesis 22: is in vitro reduction of damage in model diabetic rat cataract by taurine due to its antioxidant activity? / F. Kilic, R. Bhardwaj, J. Caulfeild, J. R. Trevithick // Exp Eye Res. – 1999. – Vol. 69, № 3. – P. 291-300. – DOI: 10.1006/exer.1999.0697.
 258. Mohazzab K. M. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium / K. M. Mohazzab, P. M. Kaminski, and M. S. Wolin // Am J Physiol. – 1994. – Vol. 266, № 6 Pt 2. – P. H2568-H2572. – DOI: 10.1152/ajpheart.1994.266.6.H2568.

259. Molecular strategies to prevent, inhibit, and degrade advanced glycoxidation and advanced lipoxidation end products / Giancarlo Aldini, Giulio Vistoli, Milan Stefek [et al.] // *Free Radical Res.* – 2013. – № 47. – P. 93-137.
260. Motiejūnaite R. Pericytes and ocular diseases / Rūta Motiejūnaite 1, Andrius Kazlauskas // *Exp Eye Res.* – 2008. – Vol. 86, № 2. – P. 171-177. – DOI: 10.1016/j.exer.2007.10.013.
261. mTOR-dependent dysregulation of autophagy contributes to the retinal ganglion cell loss in streptozotocin-induced diabetic retinopathy / Sanjar Batirovich Madrakhimov, Jin Young Yang, Jin Ha Kim [et al.] // *Cell Commun Signal.* – 2021. – Vol. 9, № 1. – P. 29. – DOI: 10.1186/s12964-020-00698-4.
262. Mukhopadhyay S. Effect of methylglyoxal modification of human α -crystallin on the structure, stability and chaperone function / S. Mukhopadhyay, M. Kar, K. P. Das // *Protein J.* – 2010. – Vol. 29, № 8. – P. 551-556. – DOI: 10.1007/s10930-010-9289-6.
263. Müller cell-derived VEGF is a significant contributor to retinal neovascularization / Yanyan Bai, Jian-xing Ma, Junjing Guo [et al.] // *J Pathol.* – 2009. – Vol. 219, № 4. – P. 446-454. – DOI: 10.1002/path.2611.
264. Müller cell-derived VEGF is essential for diabetes-induced retinal inflammation and vascular leakage / Juanjuan Wang, Xueliang Xu, Michael H. Elliott [et al.] // *Diabetes.* – 2010. – Vol. 59, № 9. – P. 2297-2305. – DOI: 10.2337/db09-1420.
265. Multiple variants in vascular endothelial growth factor (VEGFA) are risk factors for time to severe retinopathy in type 1 diabetes: the DCCT/EDIC genetics study / Hussam Al-Kateb, Lucia Mirea, Xinlei Xie [et al.] // *Diabetes.* – 2007. – Vol. 56, № 8. – P. 2161-2168. – DOI: 10.2337/db07-0376.
266. Murakami T. Occludin phosphorylation and ubiquitination regulate tight junction trafficking and vascular endothelial growth factor-induced permeability / Tomoaki Murakami, Edward A. Felinski, David A. Antonetti // *J Biol Chem.* – 2009. – Vol. 284, № 31. – P. 21036-21046. – DOI: 10.1074/jbc.M109.016766.

267. Neovascular glaucoma: a review / Gustavo B. Rodrigues, Ricardo Y. Abe, Camila Zangalli [et al.] // *Int J Retina Vitreous*. – 2016. – Vol. 2. – P. 26. – DOI: 10.1186/s40942-016-0051-x.
268. Neovascular secondary glaucoma, etiology and pathogenesis / I. Ramona Barac, Monica Daniela Pop, Andrei Ionut Gheorghe, Corina Taban // *Rom J Ophthalmol*. – 2015. – Vol. 59, № 1. – P. 24-28.
269. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis / M. Ziche, L. Morbidelli, R. Choudhuri [et al.] // *J Clin Invest*. – 1997. – Vol. 99, № 11. – P. 2625-2634. – DOI: 10.1172/JCI119451.
270. Non-enzymatic glycation of α -crystallin as an in vitro model for aging, diabetes and degenerative diseases / Devi Kalyan Karumanchi, Nuwan Karunaratne, Laurence Lurio [et al.] // *Amino Acids*. – 2015. – Vol. 47, № 12. – P. 2601-2608. – DOI: 10.1007/s00726-015-2052-8.
271. Notoginsenoside R1 Ameliorates Diabetic Retinopathy through PINK1-Dependent Activation of Mitophagy / Ping Zhou, Weijie Xie, Xiangbao Meng [et al.] // *Cells*. – 2019. – Vol. 8, № 3. – P. 213. – DOI: 10.3390/cells8030213. – Erratum in: *Cells*. 2020 Feb 17;9(2).
272. Novel atypical PKC inhibitors prevent vascular endothelial growth factor-induced blood-retinal barrier dysfunction / Paul M. Titchenell, Cheng-Mao Lin, Jason M. Keil [et al.] // *Biochem J*. – 2012. – Vol. 446, № 3. – P. 455-467. – DOI: 10.1042/BJ20111961.
273. Novel roles for the lens in preserving overall ocular health / Julie C. Lim, Ankita Umapathy, Angus C. Grey [et al.] // *Experimental eye research*. – 2017. – Vol. 156. – P. 117-123. – DOI: 10.1016/j.exer.2016.05.027.
274. Olmesartan blocks advanced glycation end products (AGEs)-induced angiogenesis in vitro by suppressing receptor for AGEs (RAGE) expression / Sho-ichi Yamagishi, Takanori Matsui, Kazuo Nakamura [et al.] // *Microvasc Res*. – 2008. – Vol. 75, № 1. – P. 130-134. – DOI: 10.1016/j.mvr.2007.05.001.

275. ON-type retinal ganglion cells are preferentially affected in STZ-induced diabetic mice / Run-Ze Cui, Lu Wang, Sheng-Nan Qiao [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2019. – Vol. 60, № 5. – P. 1644-1656. – DOI: 10.1167/iovs.18-26359.
276. Oxidative stress caused by glycation of Cu, Zn-superoxide dismutase and its effects on intracellular components / Junichi Fujii, Theingi Myint, Ayako Okado [et al.] // *Nephrol Dial Transplant.* – 1996. – Vol. 11, № Suppl 5. – P. 34-40. – DOI: 10.1093/ndt/11.suppl5.34.
277. Oxidative stress in the trabecular meshwork (Review) / Jing Zhao, Shuang Wang, Wei Zhong [et al.] // *Int J Mol Med.* – 2016. – Vol. 38, № 4. – P. 995-1002. – DOI: 10.3892/ijmm.2016.2714.
278. Oxidative stress induces ferroptotic cell death in retinal pigment epithelial cells / Kiyohito Totsuka, Takashi Ueta, Takatoshi Uchida [et al.] // *Exp Eye Res.* – 2019. – Vol. 181. – P. 316-324. – DOI: 10.1016/j.exer.2018.08.019.
279. Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients / Sandra M. Ferreira 1, S. Fabián Lerner, R. Brunzini [et al.] // *Am J Ophthalmol.* – 2004. – Vol. 137, № 1. – P. 62-69. – DOI: 10.1016/s0002-9394(03)00788-8.
280. Oxidative stress response signaling pathways in trabecular meshwork cells and their effects on cell viability / Nanako Awai-Kasaoka, Toshihiro Inoue, Takanori Kameda [et al.] // *Mol Vis.* – 2013. – Vol. 19. – P. 1332-1340.
281. Oxidative stress-related mechanisms and antioxidant therapy in diabetic retinopathy / Cheng Li, Xiao Miao, Fengsheng Li [et al.] // *Oxid Med Cell Longev.* – 2017. – Vol. 2017. – P. 9702820. – DOI: 10.1155/2017/9702820.
282. Oxidative stress-related molecular biomarker candidates for glaucoma / Gözde Hondur, Emre Göktas, Xiangjun Yang [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2017. – Vol. 58, № 10. – P. 4078-4088. – DOI: 10.1167/iovs.17-22242.
283. Park C. H. Effect of advanced glycation end products on oxidative stress and senescence of trabecular meshwork cells / Cheul Ho Park, Jae Woo Kim // *Korean J Ophthalmol.* – 2012. – Vol. 26, № 2. – P. 123-131. – DOI: 10.3341/kjo.2012.26.2.123.

284. Pathophysiology of diabetic retinopathy / Joanna M. Tarr, Kirti Kaul, Mohit Chopra [et al.] // *ISRN Ophthalmol.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 343560. – DOI: 10.1155/2013/343560.
285. PDGF and TGF-beta mediate collagen production by mesangial cells exposed to advanced glycosylation end products / D. C. Throckmorton, A. P. Brogden, B. Min [et al.] // *Kidney Int.* – 1995. – Vol. 48, № 1. – P. 111-117.
286. PERK pathway are involved in NO-induced apoptosis in endothelial cells cocultured with RPE under high glucose conditions / Xiang Zhang, Yuxuan Fu, Xiaoyan Xu [et al.] // *Nitric Oxide.* – 2014. – Vol. 40. – P. 10-16. – DOI: 10.1016/j.niox.2014.05.001.
287. Pharmacokinetic rationale for dosing every 2 weeks versus 4 weeks with intravitreal ranibizumab, bevacizumab, and aflibercept (vascular endothelial growth factor Trap-eye) / Michael W. Stewart, Philip J. Rosenfeld, Fernando M. Penha [et al.] // *Retina.* – 2012. – Vol. 32, № 3. – P. 434-457. – DOI: 10.1097/IAE.0B013E31822C290F.
288. Pharmacologic approaches against advanced glycation end products (AGEs) in diabetic cardiovascular disease / Antonio Nenna, Francesco Nappi, Sanjeet Singh Avtaar Singh [et al.] // *Res. Cardiovasc. Med.* – 2015. – Vol. 4, № 2. – P. e26949.
289. Phospholipase D1 modulates protein kinase C-epsilon in retinal pigment epithelium cells during inflammatory response / Paula E. Tenconi, Norma M. Giusto, Gabriela A. Salvador, Melina V. Mateos // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2016. – Vol. 81, № Pt A. – P. 67-75. – DOI: 10.1016/j.biocel.2016.10.015.
290. Photoreceptor cells are major contributors to diabetes-induced oxidative stress and local inflammation in the retina / Yunpeng Du, Alexander Veenstra, Krzysztof Palczewski, Timothy S Kern // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – Vol. 110. – P. 16586-16591. – DOI: 10.1073/pnas.1314575110.
291. Photoreceptor cells produce inflammatory mediators that contribute to endothelial cell death in diabetes / Deoye Tonade, Haitao Liu, Timothy S. Kern // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2016. – Vol. 57 – P. 4264-4271. – DOI: 10.1167/iovs.16-19859.

292. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) prevents diabetes- or advanced glycation end products (AGE)-elicited retinal leukostasis / Sho-ichi Yamagishi 1, Takanori Matsui, Kazuo Nakamura [et al.] // *Microvasc Res.* – 2006. – Vol. 72, № 1-2. – P. 86-90. – DOI: 10.1016/j.mvr.2006.04.002.
293. PKC delta and NADPH oxidase in AGE-induced neuronal death / Mariapaola Nitti, Anna L. Furfaro, Nicola Traverso [et al.] // *Neurosci Lett.* – 2007. – Vol. 416, № 3. – P. 261-265. – DOI: 10.1016/j.neulet.2007.02.013.
294. Porter K. M. Up-regulated expression of extracellular matrix remodeling genes in phagocytically challenged trabecular meshwork cells / Kristine M. Porter, David L. Epstein, Paloma B. Liton // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 4. – P. e34792. – DOI: 10.1371/journal.pone.0034792.
295. Prasad K. Therapeutic Interventions for Advanced Glycation-End Products and its Receptor- Mediated Cardiovascular Disease / Kailash Prasad, Shuchita Tiwari // *Curr Pharm Des.* – 2017. – Vol. 23, № 6. – P. 937-943. – DOI: 10.2174/1381612822666161006143032.
296. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability / Dai Fukumura, Takeshi Gohongi, Ananth Kadambi [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2001. – Vol. 98, № 5. – P. 2604-2609. – DOI: 10.1073/pnas.041359198.
297. Pregabalin affords retinal neuroprotection in diabetic rats: Suppression of retinal glutamate, microglia cell expression and apoptotic cell death / Shimaa A. Ali, Sawsan A. Zaitone, Amina A. Dessouki, Azaa A. Ali // *Exp Eye Res.* – 2019. – Vol. 184. – P. 78-90. – DOI: 10.1016/j.exer.2019.04.014.
298. Prevalence of diabetic retinopathy and cataract in adult patients with type 1 and type 2 diabetes in Russia / Ivan Dedov, Oxana Maslova, Yuri S. Suntsov [et al.] // *Rev Diabet Stud.* – 2009. – Vol. 6, № 2. – P. 124-129. – DOI: 10.1900/RDS.2009.6.124.
299. Prevention of α -crystallin glycation and aggregation using l-lysine results in the inhibition of in vitro catalase heat-induced-aggregation and suppression of cataract formation in the diabetic rat / Fereshteh Bahmani, S. Zahra Bathaie, S. Javid

- Aldavood, Arezou Ghahghaei // *Int J Biol Macromol.* – 2019. – Vol. 132. – P. 1200-1207. – DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.037.
300. Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition / K. Miyamoto, S. Khosrof, S. E. Bursell, [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1999. – Vol. 96, № 19. – P. 10836-10841. – DOI: 10.1073/pnas.96.19.10836.
 301. Preventive effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on peroxide mediated oxidative stress responses in primary human trabecular meshwork cells / Theofilos Tourtas, Marco T. Birke, Friedrich E. Kruse [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 2. – P. e31340. – DOI: 10.1371/journal.pone.0031340.
 302. Probucol promotes high glucose-induced proliferation and inhibits apoptosis by reducing reactive oxygen species generation in Müller cells / Xuxia Zhou, ShiBei Ai, ZhongPing Chen, ChenXiang Li // *International Ophthalmology.* – 2091. – Vol. 39, № 12. – P. 2833-2842.
 303. Protection against advanced glycation end products and oxidative stress during the development of diabetic keratopathy by KIOM-79 / Junghyun Kim, Chan-Sik Kim, Hyojun Kim [et al.] // *J Pharm Pharmacol.* – 2011. – Vol. 63, № 4. – P. 524-530. – DOI: 10.1111/j.2042-7158.2010.01206.x.
 304. Protective effects of taurine against alloxan-induced diabetic cataracts and refraction changes in New Zealand White rabbits / Yu-Wen Hsu, Shang-Min Yeh, Ya-Yu Chen [et al.] // *Exp Eye Res.* – 2012. – Vol. 103. – P. 71-77. – DOI: 10.1016/j.exer.2012.08.001
 305. Protein kinase C beta2-dependent phosphorylation of core 2 GlcNAc-T promotes leukocyte-endothelial cell adhesion: a mechanism underlying capillary occlusion in diabetic retinopathy / Rakesh Chibber, Bahaedin M. Ben-Mahmud, Giovanni E. Mann [et al.] // *Diabetes.* – 2003. – Vol. 52, № 6. – P. 1519-1527. – DOI: 10.2337/diabetes.52.6.1519.
 306. Protein kinase c β phosphorylates occludin regulating tight junction trafficking in vascular endothelial growth factor-induced permeability in vivo / Tomoaki

- Murakami, Tiffany Frey, Chengmao Lin, David A. Antonetti // *Diabetes*. – 2012. – Vol. 61, № 6. – P. 1573-1583. – DOI: 10.2337/db11-1367.
307. Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase / Toyoshi Inoguchi, Toshiyo Sonta, Hirotaka Tsubouchi [et al.] // *J Am Soc Nephrol*. – 2003. – Vol. 14, № 8 Suppl 3. – P. S227-S232. – DOI: 10.1097/01.asn.0000077407.90309.65.
 308. Protein kinase C-gamma activation in the early streptozotocin diabetic rat lens / Dingbo Lin, Richie Harris, Rachael Stutzman [et al.] // *Curr Eye Res*. – 2007. – Vol. 32, № 6. – P. 523-532. – DOI: 10.1080/02713680701418124.
 309. Protein kinase C-mediated regulation of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase production in a human retinal müller cells / Yoshiki Miyata, Miho Kase, Yuko Sugita [et al.] // *Curr Eye Res*. – 2012. – Vol. 37, № 9. – P. 842-849. – DOI: 10.3109/02713683.2012.682635.
 310. Protocatechualdehyde prevents methylglyoxal-induced mitochondrial dysfunction and AGEs-RAGE axis activation in human lens epithelial cells / Yue-Hua Wang, Yu-Pei Han, Hai-Tao Yu [et al.] // *Eur J Pharmacol*. – 2014. – Vol. 738. – P. 374-383. – DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.04.045.
 311. Puerarin decreases apoptosis of retinal pigment epithelial cells in diabetic rats by reducing peroxynitrite level and iNOS expression / Li-Na Hao, Min Wang, Jun-Ling Ma, Tao Yang // *Sheng Li Xue Bao*. – 2012. – Vol. 64, № 2. – P. 199-206.
 312. Puerarin inhibits the retinal pericyte apoptosis induced by advanced glycation end products in vitro and in vivo by inhibiting NADPH oxidase-related oxidative stress / Junghyun Kim, Ki Mo Kim, Chan-Sik Kim [et al.] // *Free Radic Biol Med*. – 2012. – Vol. 53, № 2. – P. 357-365. – DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.030.
 313. Pyrazole-related nucleosides. Synthesis and antiviral/antitumor activity of some substituted pyrazole and pyrazolo[4,3-d]-1,2,3-triazin-4-one nucleosides / S. Manfredini, R. Bazzanini, P. G. Baraldi [et al.] // *J Med. Chem*. – 1992. – Vol. 35. – P. 917.

314. Quantitative mapping of scleral fiber orientation in normal rat eyes / Michaël J. A. Girard, Annegret Dahlmann-Noor, Sauparnika Rayapureddi [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2011. – Vol. 52, № 13. – P. 9684-9693. – DOI: 10.1167/iovs.11-7894.
315. Radomski M. Regulation of vascular homeostasis by nitric oxid / M W Radomski 1, S Moncada // *Tromb Haemost.* – 1993. – Vol. 70, № 1. – P. 36-41.
316. RAGE- and TGF-beta receptor-mediated signals converge on STAT5 and p21waf to control cell-cycle progression of mesangial cells: a possible role in the development and progression of diabetic nephropathy / Maria Felice Brizzi, Patrizia Dentelli, Arturo Rosso [et al.] // *FASEB J.* – 2004. – Vol. 18, № 11. – P. 1249-1251. – DOI: 10.1096/fj.03-1053fje.
317. Ramasamy, R. Advanced glycation endproducts: from precursors to RAGE: round and round we go / Ravichandran Ramasamy, Shi Fang Yan, Ann Marie Schmidt // *Amino Acids.* – 2012. – Vol. 42, № 4. – P. 1151-1161. – DOI: 10.1007/s00726-010-0773-2.
318. Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy / W. Kline Bolton, Daniel C. Cattran, Mark E. Williams [et al] // *Am J Nephrol.* – 2004. – Vol. 24, № 1. – P. 32-40. – DOI: 10.1159/000075627.
319. Rao V. R. TGF- β 2 Promotes Oxidative Stress in Human Trabecular Meshwork Cells by Selectively Enhancing NADPH Oxidase 4 Expression / Vidhya R. Rao, Evan B. Stubbs Jr // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2021. – Vol. 62, № 4. – P. 4. – DOI: 10.1167/iovs.62.4.4.
320. Rationale and application of the protocol s anti-vascular endothelial growth factor algorithm for proliferative diabetic retinopathy / Jennifer K. Sun, Adam R. Glassman, Wesley T. Beaulieu [et al.] // *Ophthalmology.* – 2019. – Vol. 126, № 1. – P. 87-95. – DOI: 10.1016/j.opht.2018.08.001.
321. Receptor for advanced glycation end product expression in experimental diabetic retinopathy / Yumei Wang, Franziska Vom Hagen, Frederick Pfister [et al.] // *Ann N Y Acad Sci.* – 2008. – Vol. 1126. – P. 42-45. – DOI: 10.1196/annals.1433.063.

322. Reddy V. S. Role of crystallins in diabetic complications / Vadde Sudhakar Reddy, G. Bhanuprakash Reddy // *Biochim Biophys Acta*. – 2016. – Vol. 1860, № 1 Pt B. – P. 269-277. – DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.05.009
323. Regulation of tumor angiogenesis by microRNAs: State of the art / Nasser H. Goradel, Nejad Mohammadi, Hamed Haghi-Aminjan [et al.] // *J Cell Physiol*. – 2019. – Vol. 234, № 2. – P. 1099-1110. – DOI: 10.1002/jcp.27051.
324. Regulation of tissue oxygen levels in the mammalian lens / Richard McNulty, Huan Wang, Richard T. Mathias [et al.] // *J Physiol*. – 2004. – Vol. 559, № Pt 3. – P. 883-898. – DOI: 10.1113/jphysiol.2004.068619.
325. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by advanced glycation end products / Caroline Treins, Sophie Giorgetti-Peraldi, Joseph Murdaca, Emmanuel Van Obberghen // *J Biol Chem*. – 2001. – Vol. 276, № 47. – P. 43836-43841. – DOI: 10.1074/jbc.M106534200.
326. Relationships of diabetes and hyperglycaemia with intraocular pressure in a Japanese population: the JPHC-NEXT Eye Study / Akiko Hanyuda, Norie Sawada, Kenya Yuki [et al.] // *Sci Rep*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 5355. – DOI: 10.1038/s41598-020-62135-3.
327. Retinal microglial activation and inflammation induced by amadori-glycated albumin in a rat model of diabetes / Ahmed S. Ibrahim, Azza B. El-Remessy, Suraporn Matragoon [et al.] // *Diabetes*. – 2011. – Vol. 60, № 4. – P. 1122-1133. – DOI: 10.2337/db10-1160.
328. Retinal vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression is altered in relation to neovascularization in oxygen induced retinopathy / Margaret L. Donahue, Dale L. Phelps, Richard H. Watkins [et al.] // *Curr Eye Res*. – 1996. – Vol. 15, № 2. – P. 175-184. – DOI: 10.3109/02713689608997411.
329. Retinoprotection by BGP-15, a Hydroximic Acid Derivative, in a Type II Diabetic Rat Model Compared to Glibenclamide, Metformin, and Pioglitazone / Zita Wachal, Mariann Bombicz, Dániel Priksz [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2020. – Vol. 21, № 6. – P. 2124. – DOI: 10.3390/ijms21062124.

330. Risks of mortality, myocardial infarction, bleeding, and stroke associated with therapies for age-related macular degeneration / Lesley H. Curtis, Bradley G. Hammill, Kevin A. Schulman, Scott W. Cousins // *Arch Ophthalmol.* – 2010. – Vol. 128, № 10. – P. 1273-1279. – DOI: 10.1001/archophthalmol.2010.223. Erratum in: *Arch Ophthalmol.* 2010;128(12):1623.
331. Rojas A. Fueling inflammation at tumor microenvironment: the role of multiligand/RAGE axis / Armando Rojas, Hector Figueroa, Erik Morales // *Carcinogenesis.* – 2010. – Vol. 31, № 3. – P. 334-341. – DOI: 10.1093/carcin/bgp322.
332. Role of Inflammation in Diabetic Retinopathy. *International journal of molecular sciences* / Anne Rübsam, Sonia Parikh, Patrice E. Fort // *International journal of molecular sciences.* – 2018. – Vol. 19, № 4. – P. 942. – DOI: 10.3390/ijms19040942.
333. Role of miR-29b on the regulation of the extracellular matrix in human trabecular meshwork cells under chronic oxidative stress / Coralía Luna, Guorong Li, Jianming Qiu [et al.] // *Mol Vis.* – 2009. – Vol. 15. – P. 2488-2497.
334. Role of moesin, Src, and ROS in advanced glycation end product-induced vascular endothelial dysfunction / Wei-Jin Zhang, Pei-Xin Li, Xiao-Hua Guo, Qiao-Bing Huang // *Microcirculation.* – 2017. – Vol. 24, № 3. – DOI: 10.1111/micc.12358.
335. Role of N-ε- carboxy methyl lysine, advanced glycation end products and reactive oxygen species for the development of nonproliferative and proliferative retinopathy in type 2 diabetes mellitus / Subhadip Choudhuri, Deep Dutta, Aditi Sen [et al.] // *Mol Vis.* – 2013. – Vol. 19. – P.100-113.
336. Roux S. Primary observation (Irwin) test in rodents for assessing acute toxicity of a test agent and its effects on behavior and physiological function / Sylvain Roux, Evelyne Sablé, Roger D Porsolt // *Curr Protoc Pharmacol.* – 2005. – Chapt. 10, Unit 10.10. – DOI: 10.1002/0471141755.ph1010s27.
337. Roy S. Mitochondrial Structural Changes in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy / Sayon Roy, Dongjoon Kim, Aravind Sankaramoorthy // *J Clin Med.* – 2019. – Vol. 8, № 9. – P. 1363. – DOI: 10.3390/jcm8091363.

338. Saad H. A. Microwave assisted synthesis of some new fused 1,2,4-triazines bearing thiophene moieties with expected pharmacological activity / Hosam A. Saad, Mohamed M. Youssef, Mosselhi A. Mosselhi // *Molecules*. – 2011. – Vol. 16, № 6. – P. 4937-4957. DOI: 10.3390/molecules16064937.
339. Sankaramoorthy A. Vascular basement membrane thickening: basis of disease pathology in diabetic retinopathy / Aravind Sankaramoorthy, Sayon Roy // *Advances in Vision Research. Vol. III: Genetic Eye Research around the Globe* / ed.: G. Prakash, T. Iwata. –Switzerland, 2021. – P. 275-287. – (Essentials in Ophthalmology). – DOI: 10.1007/978-981-15-9184-6_20.
340. Scanning electron microscopy of the trabecular meshwork: understanding the pathogenesis of primary angle closure glaucoma / Ramanjit Sihota, Amita Goyal, Jasbir Kaur [et al.] // *Indian J Ophthalmol*. – 2012. – Vol. 60, № 3. – P. 183-188. – DOI: 10.4103/0301-4738.95868.
341. Schalkwijk C. G. Early- and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: the search for therapeutics / Casper G. Schalkwijk, Toshio Miyata // *Amino Acids*. – 2012. – Vol. 42, № 4. – P. 1193-1204. – DOI: 10.1007/s00726-010-0779-9.
342. Selivanova O. M. Structural and functional peculiarities of α -crystallin / Olga M. Selivanova, Oxana V. Galzitskaya // *Biology (Basel)*. – 2020. – Vol. 9, № 4. – P. 85. – DOI: 10.3390/biology9040085seli
343. Semenza G. L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation / G. L. Semenza, G. L. Wang // *Mol Cell Biol*. – 1992. – Vol. 12, № 12. – P. 5447-5454. – DOI: 10.1128/mcb.12.12.5447-5454.
344. Sha H. Abnormal expressions of AGEs, TGF- β 1, BDNF and their receptors in diabetic rat colon-Associations with colonic morphometric and biomechanical remodeling / Hong Sha, Xiaolin Tong, Jingbo Zhao // *Sci Rep*. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 9437. – DOI: 10.1038/s41598-018-27787-2.
345. Shima D. T. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability / David

- T. Shima, Urban Deutsch, Patricia A. D'Amore // FEBS Lett. – 1995. – Vol. 370, № 3. – P. 203-208. – DOI: 10.1016/0014-5793(95)00831-s.
346. Shivarudrappa A. H. Lutein reverses hyperglycemia-mediated blockage of Nrf2 translocation by modulating the activation of intracellular protein kinases in retinal pigment epithelial (ARPE-19) cells / Arpitha Haranahalli Shivarudrappa, Ganesan Ponesakki // J Cell Commun Signal. – 2020. – Vol. 14, № 2. – P. 207-221. – DOI: 10.1007/s12079-019-00539-1.
347. Simó R. Ocular Anti-VEGF therapy for diabetic retinopathy: the role of VEGF in the pathogenesis of diabetic retinopathy / Rafael Simó, Jeffrey M. Sundstrom, David A. Antonetti // Diabetes Care. – 2014 Apr. – Vol. 37, № 4. – P. 893-899. – DOI: 10.2337/dc13-2002.
348. Slowing of peripheral motor nerve conduction was ameliorated by aminoguanidine in lenstozocin-induced diabetic rats / Yosuke Miyauchi, Hisataka Shikama, Toshiyuki Takasu [et al.] // European journal of endocrinology. – 1996. – Vol. 134, № 4. – P. 467-473.
349. Song B. J. Presence and risk factors for glaucoma in patients with diabetes / Brian J. Song, Lloyd Paul Aiello, Louis R. Pasquale // Curr Diab Rep. – 2016. – Vol. 16, № 12. – P. 124. – DOI: 10.1007/s11892-016-0815-6.
350. Spinach methanolic extract attenuates the retinal degeneration in diabetic rats / Rocio Bautista-Pérez, Agustina Cano-Martínez, Elisa Gutiérrez-Velázquez [et al.] // Antioxidants (Basel). – 2021. – Vol. 10, № 5. – P. 717. – DOI: 10.3390/antiox10050717.
351. Src mediates TGF- β -induced intraocular pressure elevation in glaucoma / Teruhisa Tsukamoto, Kentaro Kajiwara, Shigeyuki Nada, Masato Okada // J Cell Physiol. – 2019. – Vol. 234, № 2. – P. 1730-1744. – DOI: 10.1002/jcp.27044.
352. Stefanini FR, Badaró E, Falabella P, Koss M, Farah ME, Maia M. Anti-VEGF for the management of diabetic macular edema / Francisco Rosa Stefanini, Emmerson Badaró Paulo Falabella [et al.] // J Immunol Res. – 2014. – Vol. 2014. – P. 632307. – DOI: 10.1155/2014/632307.

353. Stimulation of AMPK Prevents Diabetes-Induced Photoreceptor Cell Degeneration / Shiyu Song, Shuyin Bao, Chenghong Zhang [et al.] // *Oxid Med Cell Longev.* – 2021. – Vol. 2021. – P. 5587340. – DOI: 10.1155/2021/5587340.
354. Stress responses of human retinal pigment epithelial cells to glyoxal / Cora Roehlecke, Monika Valtink, Annika Frenzel [et al.] // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* – 2016. – Vol. 254, № 12. – P. 2361-2372. – DOI: 10.1007/s00417-016-3463-2.
355. Structural and functional MRI reveals multiple retinal layers / Haiying Cheng, Govind Nair, Tiffany A. Walker [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – Vol. 103, № 46. – P. 17525-17530. – DOI: 10.1073/pnas.0605790103.
356. Studies of rat and human retinas predict a role for the polyol pathway in human diabetic retinopathy / Zeina Dagher, Yong Seek Park, Veronica Asnaghi [et al.] // *Diabetes.* – 2004. – Vol. 53, № 9 – P.2404-2411. – DOI: 10.2337/diabetes.53.9.2404.
357. Study of lipid peroxide and lipid profile in diabetes mellitus / N. P. Suryawanshi, A. K. Bhutey, A. N. Nagdeote [et al.] // *Indian J Clin Biochem.* – 2006. – Vol. 21, № 1. – P. 126-130. – DOI: 10.1007/BF02913080.
358. Sulforaphane delays diabetes-induced retinal photoreceptor cell degeneration / Jinjuan Lv, Shuyin Bao, Tianhe Liu [et al.] // *Cell Tissue Res.* – 2020. – Vol. 382, № 3. – P. 477-486. – DOI: 10.1007/s00441-020-03267-w.
359. Suppression of protein kinase C- ζ attenuates vascular leakage via prevention of tight junction protein decrease in diabetic retinopathy / Hyun Beom Song, Hyung-Oh Jun, Jin Hyung Kim [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2014. – Vol. 441, № 1. – P. 63-68. – DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.01.002.
360. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins / L. P. Aiello, E. A. Pierce, E. D. Foley [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1995. – Vol. 92, № 23. – P. 10457-10461. – DOI: 10.1073/pnas.92.23.10457.

361. Sustained stress response after oxidative stress in trabecular meshwork cells / Guorong Li, Coralia Luna, Paloma B. Liton [et al.] // *Mol Vis.* – 2007. – Vol. 13. – P. 2282-2288.
362. Swamy-Mruthinti S. Inhibition of cataracts in moderately diabetic rats by aminoguanidine / S. Swamy-Mruthinti, K. Green, E. C. Abraham // *Exp Eye Res.* – 1996. – Vol. 62, № 5. – P. 505-510. – DOI: 10.1006/exer.1996.0061.
363. Synthesis and evaluation of novel [1,2,4]triazolo[5,1-c][1,2,4]-triazines and pyrazolo[5,1-c][1,2,4]triazines as potential antidiabetic agents / Vladimir L. Rusinov, Irina M. Sapozhnikova, Anastasiya M. Bliznik [et al] // *Arch Pharm (Weinheim).* – 2017. – Vol. 350, № 5. – P. 1600361. – DOI: 10.1002/ardp.201600361.
364. Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells / Adamis A. P., Shima D. T., Yeo K. T. [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1993. – Vol. 193, № 2. – P. 631-638. – DOI: 10.1006/bbrc.1993.1671.
365. Synthesis, antibacterial activity and cytotoxicity of new fused pyrazolo[1,5-a]pyrimidine and pyrazolo[5,1-c][1,2,4]triazine derivatives from new 5-aminopyrazoles / Wedad M. Al-Adiwish, M. I. M. Tahir, A. Siti-Noor-Adnalizawati [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 64. – P. 464-476. – DOI: 10.1016/j.ejmech.2013.04.029
366. Szwergold B. S. Identification of fructose 3-phosphate in the lens of diabetic rats / B. S. Szwergold, F. Kappler, T. R. Brown // *Science (New York, N.Y.).* – 1990. – Vol. 247, № 4941. -P. 451-454. – DOI: 10.1126/science.2300805.
367. Tancrede G. Long-term changes in the diabetic state induced by different doses of streptozotocin in rats / G. Tancrede, S. Rousseau-Mignerone, A. Nadeau // *Br J Exp Pathol.* – 1983. – Vol. 64, № 2. – P. 117-123.
368. Tang J. Inflammation in diabetic retinopathy / Johnny Tang, Timothy S Kern // *Prog Retin Eye Res.* – 2011. – Vol. 30, № 5. – P. 343-358. – DOI: 10.1016/j.preteyeres.2011.05.002.

369. Tang W. Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus / Wai Ho Tang, Kathleen A. Martin, John Hwa // *Frontiers in Pharmacology*. – 2012. – Vol. 3. – P. 87.
370. Tanshinone IIA protects retinal endothelial cells against mitochondrial fission induced by methylglyoxal through glyoxalase 1 / Shuhong Qian, Yujin Qian, Dongxia Huo [et al.] // *Eur J Pharmacol*. – 2019. – Vol. 857. – P. 172419. – DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.172419.
371. Targeting the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in type 1 diabetes / Selen Le Bagge, Amelia K. Fotheringham, Sherman S. Leung, Josephine M. Forbes // *Med Res Rev*. – 2020. – Vol. 40, № 4. – P. 1200-1219. – DOI: 10.1002/med.21654.
372. Tektas O. Y. Structural changes of the trabecular meshwork in different kinds of glaucoma / Ozan-Yüksel Tektas, Elke Lütjen-Drecoll // *Exp Eye Res*. – 2009. – Vol. 88, № 4. – P. 769-775. – DOI: 10.1016/j.exer.2008.11.025.
373. Tezel G. Accelerated aging in glaucoma: immunohistochemical assessment of advanced glycation end products in the human retina and optic nerve head / Gülgün Tezel, Cheng Luo, Xiangjun Yang // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2007. – Vol. 48, № 3. – P. 1201-1211. – DOI: 10.1167/iovs.06-0737.
374. The assessment of autofluorescence of the crystalline lens in diabetic patients and healthy controls: can it be used as a screening test? / Seren Pehlivanoglu, Nur Acar, Sinan Albayrak [et al.] // *Clin Ophthalmol*. – 2018. – Vol. 12. – P. 1163-1170. – DOI: 10.2147/OPHTH.S164960.
375. The effect of the glycemic control on the aqueous humor glucose levels in diabetic patients undergoing elective cataract surgery / Nir Gomel, Irina S. Barequet, Lior Lipsky [et al.] // *Eur J Ophthalmol*. – 2021. – Vol. 31, № 2. – P. 415-421. – DOI: 10.1177/1120672120910375.
376. The effects of protein kinase C on trabecular meshwork and ciliary muscle contractility / Hagen Thieme, Jens Uwe Nass, Michael Nuskovski [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 1999. – Vol. 40, № 13. – P. 3254-3261.

377. The extract of *aster koraiensis* prevents retinal pericyte apoptosis in diabetic rats and its active compound, chlorogenic acid inhibits AGE formation and AGE/RAGE interaction / Junghyun Kim, Kyuhyung Jo, Ik-Soo Lee [et al.] // *Nutrients*. – 2016. – Vol. 8, № 9. – P. 585. – DOI: 10.3390/nu8090585.
378. The herbal combination CPA4-1 inhibits changes in retinal capillaries and reduction of retinal occludin in db/db Mice / Young Sook Kim, Junghyun Kim, Chan-Sik Kim [et al.] // *Antioxidants (Basel)*. – 2020. – Vol. 9, № 7. – P. 627. – DOI: 10.3390/antiox9070627.
379. The protective effect of beta-casomorphin-7 via promoting Foxo1 activity and nuclear translocation in human lens epithelial cells / Lihua Zhu, Jia Li, Dayang Wu, Bing Li // *Cutan Ocul Toxicol*. – 2018. – Vol. 37, № 3. – P. 267-274. – DOI:10.1080/15569527.2018.1445095.
380. The role of lipoxidation in the pathogenesis of diabetic retinopathy / Josy Augustine, Evan P. Troendle, Peter Barabas [et al.] // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2021. – Vol. 11. – P. 621938. – DOI: 10.3389/fendo.2020.621938.
381. The role of microglia in diabetic retinopathy / Jeffery G. Grigsby, Sandra M. Cardona, Cindy E. Pouw [et al.] // *J Ophthalmol*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 705783. – DOI: 10.1155/2014/705783.
382. The role of protein kinase C in modulation of aqueous humor outflow facility / Rahul N. Khurana, Pei-Feng Deng, David L. Epstein, P. Vasantha Rao // *Exp Eye Res*. – 2003. – Vol. 76, № 1. – P. 39-47. – DOI: 10.1016/s0014-4835(02)00255-5.
383. The role of transforming growth factor β in glaucoma and the therapeutic implications / Mark A. Prendes, Alon Harris, Barbara M. Wirostko [et al.] // *Br J Ophthalmol*. – 2013. – Vol. 97, № 6. – P. 680-686. – DOI: 10.1136/bjophthalmol-2011-301132.
384. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes / Michael Wei, Leslie Ong, Maree T. Smith [et al.] // *Heart Lung Circ*. – 2003. – Vol. 12, № 1. – P. 44-50. – DOI: 10.1046/j.1444-2892.2003.00160.x.

385. The trabecular meshwork: Structure, function and clinical implications. A review of the literature / J. Buffault, A. Labbé, P. Hamard [et al.] // J Fr Ophtalmol. – 2020. – Vol. 43, № 7. – P. e217-e230. – DOI: 10.1016/j.jfo.2020.05.002.
386. Thieme H, Nuskovski M, Nass JU, Pleyer U, Strauss O, Wiederholt M. Mediation of calcium-independent contraction in trabecular meshwork through protein kinase C and rho-A / Hagen Thieme, Michael Nuskovski, Jens Uwe Nass [et al.] // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2000. – Vol. 41, № 13. – P. 4240-4246.
387. Thornalley P. J. Use of aminoguanidine (pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts / Paul J. Thornalley // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2003. – Vol. 419, № 1. – P. 31-40. – DOI: 10.1016/j.abb.2003.08.013.
388. Three patients with injection of intravitreal vascular endothelial growth factor inhibitors and subsequent exacerbation of chronic proteinuria and hypertension / Ramy M. Hanna, Eduardo A. Lopez, Huma Hasnain [et al.] // Clin Kidney J. – 2019. – Vol. 12, № 1. – P. 92-100. – DOI: 10.1093/ckj/sfy060.
389. Time-lapse microscopy of oxidative stress demonstrates metabolic sensitivity of retinal pericytes under high glucose condition / Zahra Ghanian, Shima Mehrvar, Nasim Jamali [et al.] // J Biophotonics. – 2018. – Vol. 11, № 9. – P. e201700289. – DOI: 10.1002/jbio.201700289.
390. Titilii K. Embryonic hyperglycemia is linked to a reduction in photoreceptor cells and increase in oxidative stress in the retina / Kayla Titilii; Ann C Morris // Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2019. – Vol. 60, № 9. – P. 3844-3844.
391. Toda N. Nitric oxide: ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy / Noboru Toda, Megumi Nakanishi-Toda // Prog Retin Eye Res. – 2007. – Vol. 26, № 3. – P. 205-238. – DOI: 10.1016/j.preteyeres.2007.01.004.
392. TPL2 (Therapeutic Targeting Tumor Progression Locus-2)/ATF4 (Activating Transcription Factor-4)/SDF1a (Chemokine Stromal Cell-Derived Factor-a) Axis Suppresses Diabetic Retinopathy / De-Wei Lai, Keng-Hung Lin, Wayne Huey-Herng Sheu [et al.] // Circulation Research. – 2017. – Vol. 121, № 6. – P. e37-e52.

393. Trudeau K. High glucose induces mitochondrial morphology and metabolic changes in retinal pericytes / Kyle Trudeau, Anthony J. A. Molina, Sayon Roy // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2011. – Vol. 52, № 12. – P. 8657-8664. – DOI: 10.1167/iovs.11-7934.
394. Tuleta I. Diabetic fibrosis / Izabela Tuleta, Nikolaos G. Frangogiannis // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* – 2021. – Vol. 1867, № 4. – P. 166044. – DOI: 10.1016/j.bbadis.2020.166044.
395. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid / Donald R. Senger, Stephen J. Galli, Ann M. Dvorak [et al.] // *Science.* – 1983. – Vol. 219, № 4587. – P. 983-985.
396. Ueda J. Distribution of myocilin and extracellular matrix components in the juxtacanalicular tissue of human eyes / Jun Ueda, Kelly Wentz-Hunter, Beatrice Y. J. T. Yue // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2002. – Vol. 43, № 4. – P. 1068-1076.
397. UKPDS 50: risk factors for incidence and progression of retinopathy in Type II diabetes over 6 years from diagnosis / I. M. Stratton, E. M. Kohner, S. J. Aldington [et al.] // *Diabetologia.* – 2001. – Vol. 44, № 2. – P. 156-163. – DOI: 10.1007/s001250051594.
398. Use of RBC deformability index as an early marker of diabetic nephropathy / Sang Bae Lee, Yu-Sik Kim, Jung Hye Kim [et al.] // *Clin Hemorheol Microcirc.* – 2019. – Vol. 72, № 1. – P. 75-84. – DOI: 10.3233/CH-180434.
399. Van Boekel M. A. Glycation-induced crosslinking of calf lens crystallins / M. A. van Boekel, H. J. Hoenders // *Exp Eye Res.* – 1991. – Vol. 53, № 1. – P. 89-94. – DOI: 10.1016/0014-4835(91)90149-9.
400. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders / Lloyd Paul Aiello, Robert L. Avery, Paul G. Arrigg [et al.] // *N Engl J Med.* – 1994. – Vol. 331, № 22. – P. 1480-1487. – DOI: 10.1056/NEJM199412013312203.
401. Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro / William J. Lamoreaux, Malinda E. C. Fitzgerald, Anton Reiner [et al.] //

- Microvasc Res. – 1998. – Vol. 55, № 1. – P. 29-42. – DOI: 10.1006/mvre.1997.2056.
402. Vascular endothelial growth factor is induced by long-term high glucose concentration and up-regulated by acute glucose deprivation in cultured bovine retinal pigmented epithelial cells / Hirohito Sone, Yasushi Kawakami, Yukichi Okuda [et al.] // Biochem Biophys Res Commun. – 1996. – Vol. 221, № 1. – P. 193-198. – DOI: 10.1006/bbrc.1996.0568.
 403. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells / M. S. Pepper, N. Ferrara, L. Orci, R. Montesano // Biochem Biophys Res Commun. – 1991. – Vol. 181, № 2. – P. 902-906. – DOI: 10.1016/0006-291x(91)91276-i.
 404. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis / Carmen Stanca Melincovici Adina Bianca Boşca, Sergiu Şuşman [et al.] // Rom J Morphol Embryol. – 2018. – Vol. 59, № 2. – P. 455-467.
 405. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization / E. A. Pierce, R. L. Avery, E. D. Foley [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1995. – Vol. 92, № 3. – P. 905-909. – DOI: 10.1073/pnas.92.3.905.
 406. Vascular safety of ranibizumab in patients with diabetic macular edema: a pooled analysis of patient-level data from randomized clinical trials / Marco A. Zarbin, Cornelia Dunger-Baldauf, Zdenka Haskova [et al.] // JAMA Ophthalmol. – 2017. – Vol. 135, № 5. – P. 424-431. – DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2017.0455.
 407. VEGF secreted by hypoxic Müller cells induces MMP-2 expression and activity in endothelial cells to promote retinal neovascularization in proliferative diabetic retinopathy / Murilo Rodrigues, Xiaoban Xin, Kathleen Jee [et al.] // Diabetes. – 2013. – Vol. 62, № 11. – P. 3863-3873. – DOI: 10.2337/db13-0014.
 408. VEGF-Independent Activation of Müller Cells by the Vitreous from Proliferative Diabetic Retinopathy Patients / Sara Rezzola, Jessica Guerra, Adwaid Manu Krishna Chandran [et al.] // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol. 22, № 4. – P. 2179. – DOI: 10.3390/ijms22042179.

409. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects / Jocelyn Holash, Sam Davis, Nick Papadopoulos [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2002. – Vol. 99, № 17. – P. 11393-11398. – DOI: 10.1073/pnas.172398299.
410. Vitamin K1 prevents diabetic cataract by inhibiting lens aldose reductase 2 (ALR2) activity / R. Thiagarajan, M. K. N. Sai Varsha, V. Srinivasan [et al.] // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 14684. – DOI:10.1038/s41598-019-51059-2.
411. Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema / Hideharu Funatsu, Hidetoshi Yamashita, Shinko Nakamura [et al.] // *Ophthalmology.* – 2006. – Vol. 113, № 2. – P. 294-301.
412. Vitreous levels of vascular cell adhesion molecule and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy: a case-control study / Cristina Hernández, Rosa Burgos, Ana Cantón [et al.] // *Diabetes Care.* – 2001. – Vol. 24, № 3. – P. 516-521. – DOI: 10.2337/diacare.24.3.516.
413. Wang J. J. Functions of Müller cell-derived vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy / Juan-Juan Wang, Meili Zhu, Yun-Zheng Le // *World J Diabetes.* – 2015. – Vol. 6, № 5. – P. 726-733. – DOI: 10.4239/wjd.v6.i5.726.
414. Wang S. Novel targets against retinal angiogenesis in diabetic retinopathy / Shuang Wang, James K. Park, Elia J. Duh // *Curr Diab Rep.* – 2012. – Vol. 12, № 4. – P. 355-363. – DOI: 10.1007/s11892-012-0289-0.
415. Wang W. DJ-1 protects retinal pericytes against high glucose-induced oxidative stress through the Nrf2 signaling pathway / Wanpeng Wang, Han Zhao, Baihua Chen // *Sci Rep.* – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 2477. – DOI: 10.1038/s41598-020-59408-2.
416. Wang Y. Niaspan inhibits diabetic retinopathy-induced vascular inflammation by downregulating the tumor necrosis factor- α pathway / Yang Wang, Xiangda Meng, Hua Yan // *Mol Med Rep.* – 2017. – Vol. 15, № 3. – P. 1263-1271. – DOI: 10.3892/mmr.2017.6146.
417. Warboys C. M. Role of NADPH oxidase in retinal microvascular permeability increase by RAGE activation / Christina M. Warboys, Hong-Boon Toh, Paul

- A. Fraser // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2009. – Vol. 50, № 3. – P. 1319-1328. – DOI: 10.1167/iovs.08-2730.
418. Wiederholt M. The regulation of trabecular meshwork and ciliary muscle contractility / M. Wiederholt, H. Thieme, F. Stumpff // *Prog Retin Eye Res.* – 2000. – Vol. 19, № 3. – P. 271-295. – DOI: 10.1016/s1350-9462(99)00015-4.
 419. Wilkinson-Berka J. L. Vasoactive factors and diabetic retinopathy: vascular endothelial growth factor, cyclooxygenase-2 and nitric oxide / Jennifer L. Wilkinson-Berka // *Curr Pharm Des.* – 2004. – Vol. 10, № 27. – P. 3331-3348. – DOI: 10.2174/1381612043383142.
 420. Winkler B. S. Multiple NADPH-producing pathways control glutathione (GSH) content in retina / B. S. Winkler, N. DeSantis, F. Solomon // *Exp Eye Res.* – 1986. – Vol. 43, № 5. – P. 829-847. – DOI: 10.1016/s0014-4835(86)80013-6.
 421. Wojnar W. Diosmin ameliorates the effects of oxidative stress in lenses of streptozotocin-induced type 1 diabetic rats / Weronika Wojnar, Ilona Kaczmarczyk-Sedlak, Maria Zych // *Pharmacological reports: PR.* – 2017. – Vol. 69, № 5. – P. 995–1000. – DOI: 10.1016/j.pharep.2017.04.005.
 422. Wong V. H. Clinical and experimental links between diabetes and glaucoma / Vickie H. Y. Wong, Bang V. Bui, Algis J. Vingrys // *Clin Exp Optom.* – 2011. – Vol. 94, № 1. – P. 4-23. – DOI: 10.1111/j.1444-0938.2010.00546.x.
 423. Xueshuantong for Injection (Lyophilized) Alleviates Streptozotocin-Induced Diabetic Retinopathy in Rats / Rui-Lin Li, Jin-Xin Wang, Li-Juan Chai [et al.] // *Chin J Integr Med.* – 2020. – Vol. 26, № 11. – P. 825-832. – DOI: 10.1007/s11655-020-3088-5.
 424. Yamagishi, S. Advanced glycation end products (AGEs), oxidative stress and diabetic retinopathy / Sho-ichi Yamagishi, Takanori Matsui // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 12. – P. 362-368. – DOI: 10.2174/138920111794480534.
 425. Yan H. Gamma III-crystallin is the primary target of glycation in the bovine lens incubated under physiological conditions / Hong Yan, Antony C. Willis, John

- J. Harding // *Biochem J.* – 2003. – Vol. 374, № Pt 3. – P. 677-685. – DOI: 10.1042/BJ20030542.
426. Yan H. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase / Hong Yan, J. John Harding // *Biochem J.* – 1997. – Vol. 328, № Pt 2. – P. 599-605. – DOI: 10.1042/bj3280599.
 427. Yin H. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis / Huiyong Yin, Libin Xu, Ned A. Porter // *Chem Rev.* – 2011. – Vol. 111, № 10. – P. 5944-5972. – DOI: 10.1021/cr200084z.
 428. Yoshida S. Induction of IL-8, MCP-1, and bFGF by TNF-alpha in retinal glial cells: implications for retinal neovascularization during post-ischemic inflammation / Shigeo Yoshida, Ayako Yoshida, Tatsuro Ishibashi // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* – 2004. – Vol. 242, № 5. – P. 409-413. – DOI: 10.1007/s00417-004-0874-2.
 429. Zhao W. Fructose induced deactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and its prevention by pyruvate: implications in cataract prevention / Wei Zhao, P. S. Devamanoharan, Shambhu D. Varma // *Free Radic Res.* – 1998. – Vol. 29, № 4. – P. 315-320. – DOI: 10.1080/10715769800300351.
 430. Zhou L. Oxidative stress affects cytoskeletal structure and cell-matrix interactions in cells from an ocular tissue: The trabecular meshwork / Lili Zhou, Yuhong Li, Beatrice Y. J. T. Yue // *J Cell Physiol.* – 1999. – Vol. 180. – P. 182-189.
 431. Zhu H.-C. Correlations of insulin resistance and HbA1c with cytokines IGF-1, bFGF and IL-6 in the aqueous humor of patients with diabetic cataract / H.-C. Zhu, Y. Tao, Y.-M. Li // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2019. – Vol. 23, № 1. – P. 16-22. – DOI: 10.26355/eurrev_201901_16742.
 432. Zong H. AGEs, RAGE, and diabetic retinopathy / Hongliang Zong, Micheal Ward, Alan W. Stitt // *Curr Diab Rep.* – 2011. – Vol. 11, № 4. – P. 244-252. – DOI: 10.1007/s11892-011-0198-7.