ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСКРИПТОМА СЕТЧАТКИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ ПРИ ИНТРАВИТРЕАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ VEGF

Гаврилова Н.А., Гаджиева Н.С., Комова О.Ю., Филиппова Э.В., Горемыкина Н.Б.

ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, e-mail: n.gavrilova@mail.ru

Макулярный отек в результате нарушения проницаемости гематоретинального барьера достаточно часто является причиной слабовидения и потери зрения при такой патологии сетчатки как диабетическая ретинопатия, влажная форма возрастной макулярной дегенерации и окклюзия вен сетчатки. В нарушении гематоретинального барьера при каждой из данных патологий важную роль играет васкулоэндотелиальный фактор роста. Проведен анализ изменений транскриптома сетчатки у мышей линии C57BL/6J при интравитреальном введении VEGF₁₆₅. Выявлены гены, уровень экспрессии которых достоверно (p< 0,01) изменился – гены мембранных белков плотного контакта и молекул межклеточной адгезии, гены участвующие в регуляции неоангиогенеза, структурных клеточных функций, процессов клеточной пролиферации, трансмембранного переноса белков и микроэлементов, сигналинга, синаптической передачии другие.

Ключевые слова: сетчатка, гематоретинальный барьер, эндотелиальный фактор роста, экспрессия генов

CHANGES IN EXPERIMENTAL RETINA TRANSCRIPTOME WHEN THE INTRAVITREAL VEGF

Gavrilova N.A., Gadzhieva N.S., Komova O.Y., Filippova E.V., Goremykina N.B.

Moscow State University of Medicine and Dentistry n.a. A.I. Evdokimov, Moscow, e-mail: n.gavrilova@mail.ru

Macular edema as a result of violation of the permeability of blood-retinal barrier quite often the cause of low vision and blindness in such a retinal pathology as diabetic retinopathy, wet form of age-related macular degeneration and retinal vein occlusion. In violation of the blood-retinal barrier at each of these pathologies play an important role vaskuloendotelialny growth factor. The analysis of changes in the retina transcriptome in C57BL / 6J mice line with intravitreal injection of VEGF₁₆₅ Identified genes whose expression level was significantly (p < 0,01) changed – the genes of membrane proteins close contact and intercellular adhesion molecules, genes involved in the regulation of neoangiogenesis, structural cellular function, cell proliferation, transcription, differentiation, transmembrane transport protein and trace elements, signaling, synaptic transmissionprocesses and other.

Keywords: retina, blood-retinal barrier, endothelial growth factor, gene expression

Макулярный отек в результате нарушения проницаемости гематоретинального барьера достаточно часто является причиной слабовидения и потери зрения у лиц преимущественно трудоспособного возраста при такой патологии сетчатки как диабетическая ретинопатия, влажная форма возрастной макулярной дегенерации и окклюзия вен сетчатки.

В нарушении гематоретинального барьера при каждой из данных патологий важную роль играет васкулоэндотелиальный фактор роста (Vascular endothelial growth factor – VEGF) [21; 23; 45; 56; 65]. Современный уровень развития технологий позволяет на сегодняшний день проводить изучение молекулярно-генетических основ формирования патологии и идентифицировать ключевые регуляторные механизмы, участвующие в наступлении эффектов от проводимого лечения. Изучение молекулярных механизмов влияния VEGF на сетчатку позволит получить дополнительное представление не только о механизмах развития патологии, связанной с этим фактором, но и механизмах проведения лечения (анти VEGF – терапия, лазеркоагуляция) и повышения его эффективности, поможет идентифицировать гены для разработки будущих терапевтических стратегий.

Цель – исследовать изменения экспрессии генов в сетчатке при интравитреальном введении VEGF в эксперименте.

Материалы и методы исследования

Работу проводили на 4–5 недельных самцах мышей линии C57BL/6J.

Результаты исследования генотипа мыши свидетельствуют, что 80% генов этого животного и человека идентичны и 99% генов очень похожи, длина генетического кода мыши меньше, чем человека всего лишь на 14% [16]. В связи с этим лабораторные мыши являются основной моделью для проведения биомедицинских исследований. При проведении исследований руководствовались требованиями «Международных рекомендаций по проведению медико – биологических исследований с использованием животных». Все процедуры выполняли в соответствии с международными правилами обращения с животными (National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publications No. 80023, 1996).

УДК 61:575: 617.735

Под общим наркозом (внутрибрюшинная инъекция кетамина 100 мг/кг и ксилазина 5 мг/кг) с помощью шприца Hamilton было произведено интравитреальное введение рекомбинантного VEGF₁₆₅ (R & D Systems) 50 нг/мл в 2 мкл фосфатно-солевого буферного раствора PBS (6 глаз), в контрольные глаза вводили PBS (6 глаз). Установлено, что через 24 часа после интравитреального введения 50 нг/мл VEGF животным сосудистая проницаемость увеличивается более, чем в 3 раза [41; 53; 62; 76].

Через сутки после введения VEGF выделенные образцы тканей (нейроэпителий, пигментный эпителий) были переданы для транскрипционного анализа в ЗАО «Геноаналитика» (Москва).

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

Результаты исследования и их обсуждение

Регуляция экспрессии генов мембранных белков плотного контакта

Выявлено снижение экспрессии генов мембранных белков плотного контакта Ocln и Cldn –1, –2, –3, –5, –10, – 11 и 19, которые экспрессируются в эндотелии сосудов сетчатки и пигментном эпителии и обеспечивают их барьерные функции [33; 42].

В предыдущих экспериментальных работах было установлено, что в эндотелии сосудов сетчатки снижается экспрессия окклюдина и клаудинов -1 и -3 при использовании VEGF и при экспериментальном аутоиммуном ретините [18; 19; 75]. На модели кислород-индуцированной ретинопатии, наоборот, было выявлено, что экспрессия клаудинов -1, -2 и -5 увеличивается и полученный результат авторы связывают с формированием неоваскуляризации [39]. На культуре фетальных клеток пигментного эпителия было установлено, что VEGF на экспрессию Cldn -3,- 10 и 19 существенно не влияет [44]. При культивировании клеток пигментного эпителия в условиях высокой концентрации глюкозы и гипоксии снижается экспрессия окклюдина и клаудина-1 [70]. Полученные нами данные могут свидетельствовать о снижении экспрессии генов мембранных белков плотного контакта, как в эндотелии сосудов сетчатки, так и в пигментном эпителии.

Снизилась экспрессия гена Ppap2b (Lpp3), который относится к мембранным гликопротеинам и отвечает за межклеточную адгезию эндотелиальных клеток. Установлено, что при инактивации LPP3 в эндотелии сосудов сосудистая проницаемость увеличивается в 2 раза [43].

Снизилась экспрессия генов Ndst1, кодирующего гепарансульфат и Hs3st3a1, отвечающего за биосинтез гепарансульфата – одного из компонентов эндотелиального гликокаликса, поддерживающего функции сосудистой стенки.

В 8 раз увеличилась экспрессия гранулярного мембранного белка – гликопротеина 2 (Gp2), который активирует эндотелиальные клетки и снижает функции эндотелиального барьера.

Регуляция экспрессии генов молекул межклеточной адгезии

Увеличилась экспрессия молекул межклеточной адгезии Icam-1 и 2 в 2,1 и 5,2 раза, Vcam-1 в 3,2 раза, CD44 в 6 раз и хемокина – Cx3cl1 в 3,2 раза, что свидетельствует об усилении процессов межклеточных взаимодействий и клеточной адгезии. Роль молекулы СХЗС, принадлежащей к подсемейству хемокинов в формировании сосудистой патологии сетчатки меньше всего изучена, в связи с этим приводим данные только по данной молекуле. Установлено, что CX3CL1 стимулирует неоангиогенез у мышей с кислород-индуцированной ретинопатией, уровень его содержания увеличивается у пациентов в стекловидном теле при пролиферативной диабетической ретинопатии [78], у мышей с экспериментальным диабетом увеличивается уровень его экспрессии в сетчатке [54].

Экспрессия гена St3gal6, который играет ключевую роль в синтезе сиалил-лиганда клеточной адгезии Е – селектина, выполняющего важную роль в инициации связывания лейкоцитов с эндотелием снизилась.

Регуляция неоангиогенеза

Увеличилась экспрессия генов Rhbdf1 в 1,5 раза и Psen2 – в 325 раз. Rhbdf1 принадлежит к семейству сериновых протеиназ (ромбоидов), расщепляющих белки, аналогичные эпидермальному фактору роста и в связи с этим обладает антиангиогенными свойствами. Psen2 – пресенилин-2 относится к семейству аспартатных протеиназ, расщепляющих внутримембранные рецепторные белки 1 типа и тоже обладает антиангиогенными свойствами, участвуя в реализации эффектов Notch сигнального пути, блокирующего ангиогенез. Установлено, что при повышении активности Notch сигнального пути формирование лазер-индуцированной хориоидальной неоваскуляризации блокируется и, наоборот, при его ингибировании активируется [7]. На модели кислород-индуцированной ретинопатии установлено, что в сетчатке увеличивается уровень экспрессии Psen2 [38] и Rhbdf1 [29].

Увеличилась экспрессия Tsp1 в 1,2 раза. Тромбоспондин-1 — белок внеклеточного матрикса, ингибирует эндотелиальную клеточную пролиферацию, миграцию и ангиогенез. На модели кислород-индуцированной ретинопатии было установлено, что в период активного формирования неоваскуляризации в эндотелии ретинальных сосудов экспрессия TSP-1 увеличивается; при дополнительной VEGF стимуляции наблюдается сначала снижение его экспрессии, затем наоборот, увеличение в 3 раза по принципу отрицательной обратной связи [64].

Повысилась экспрессия гена Igfbp4 -ИФР _ связывающего белка, типа 4 в 1,24 раза. Igfbp4, образует комплекс с инсулиноподобным фактором роста 1 и не позволяет ему связаться с «родными» рецепторами на клетках-мишенях, блокируя тем самым его эффект – стимулировать неоангиогенез. На экспериментальной модели кислород-индуцированной ретинопатии различными авторами было выявлено увеличение экспрессии в сетчатке различных типов ИФР – связующих белков. Одни авторы выявили увеличение экспрессии Igfbp2, Igfbp4 и Igfbp5 на фоне низкой экспрессии Igfbp3 и Igfbp6 [71], другие – увеличение экспрессии Igfbp3 более чем в 5 раз в областях формирования неоваскуляризации [35]. У пациентов с непролиферативной и пролиферативной диабетической ретинопатией в стекловидном теле выявлено увеличение концентрации Igfbp2 и Igfbp3 в 1,5 и 13 раз, соответственно [40; 46; 60].

Снизилась экспрессия гена Irs2, кодирующего субстрат инсулинового рецептора 2 и участвующего в реализации физиологических функций инсулина и факторов роста [74].

Снизилась экспрессия Egr1, участвующего в передаче сигналов VEGF-A/VEGFR2 и регуляции пролиферативных процессов в эндотелии, при его блокаде, с использованием NAB2, VEGF-индуцированная экспрессия генов в эндотелиальных клетках снижается и ангиогенез ингибируется [37; 52].

Увеличилась экспрессия уридин-фосфорилазы 1 (Upp1) в 2,6 раза. Уридин-фосфорилаза входит в состав класса пиримидиновых нуклеозидфосфорилаз, катализирует реакцию расщепления гликозидной связи в уридине и обладает выраженными проангиогенными свойствами. Установлено, что в результате блокады уридин – фосфорилазы блокируется лазериндуцированная хориоидальная неоваскуляризация [77].

Регуляция структурных клеточных функций

Повысилась экспрессия 7 генов из семейства промежуточных цитоскелетных филаментов (Krt 17 – в 4,8, Krt 19, Krt 13, Krt 23, Krt 15, Krt 14 и Krt 6b, соответственно, в 3,0 -2,7-2,5-2,3-2,2 и 1,5 раза). Промежуточные филаменты играют важную роль в поддержании структурной целостности внутренних слоев сетчатки, особенно клеток Мюллера. При аргон-лазерной коагуляции сетчатки в ганглиозном слое и слое нервных волокон было выявлено повышение уровня экспрессии Krt 1–12 [13]. В сетчатке крыс ОХҮЅ (преждевременно стареющие крысы) в возрасте 3 месяцев экспрессия Krt 1-12, наоборот снижается, что с точки зрения автора свидетельствует о нарушении взаимодействий между клетками и внеклеточным матриксом [4].

В 3,1 раза повысился уровень экспрессии муцина 1 (Muc1) – трансмембранного гликопротеина, входящего в состав волокон клеток Мюллера, формирующих наружную и внутреннюю пограничные мембраны и выполняющего функции клеточного протектора [67].

Увеличилась экспрессия гена ядерной ламины (фибриллярный белок) (Lmna), также обеспечивающего структурную функцию.

Экспрессия кальпаина 1 (Capns1) увеличилась в 1,75 раза, установлена его связь с нейродегенеративными процессами и пигментным ретинитом. Кальпаины – Са²⁺-зависимые цистеиновые протеиназы, осуществляют деградацию белков, являющихся компонентами цитоскелета [4]. Содержатся в нервной ткани в двух формах – растворимой и мембраносвязанной, которая преимущественно ассоциирована с миелином и обнаруживается в синаптических мембранах, расщепляет большинство белков цитоскелета и нейрофиламентов, белки микротрубочек, основной белок миелина, глиальный фибриллярный кислый белок, тубулин, спектрин и миофибриллярные белки.

Экспрессия белков – кристаллинов – Сгуда, Сгудс, Сгудп, Сгудf и Сгуде, относящихся к группе структурных генов. Функция кристаллинов заключается в защите белков от неправильного сворачивания и аггрегации, т.е. они являются шаперонами. На экспериментальных моделях глаукомы было выявлено наличие снижения экспрессии белков-кристаллинов в сетчатке [8; 47; 61], в сетчатке крыс ОХҮЅ экспрессия кристаллинов Crygb, Crygs, Cryab, Cryba2 и Crygd снижается в 10 раз [4]. На моделях животных при лазерной коагуляции сетчатки, повреждении зрительного нерва и стрептозотоциновом диабете выявлено, наоборот повышение экспрессии кристаллинов [13; 28; 51; 72]. Хі J. с соавт. [73] и Templeton J.P. с соавт. [66] считают, что интерпретировать различия в экспрессии кристаллина в сетчатке следует с осторожностью, так как они значительно варьируются и зависят от инициирующего стимула.

Регуляция процессов клеточной пролиферации транскрипции (построение РНК по комплементарной ДНК) и дифференциации

В обеспечении скоординированного баланса между процессами клеточной пролиферации и дифференциации важную роль играет Нірро – киназный сигнальный путь, одним из компонентов которого является Sav1 (гомолог Салвадор 1, известный также как WW45), находящийся, как и большинство других компонентов этого пути в «спящем» состоянии во взрослом организме. Нірро – киназный сигнальный путь играет решающую роль в процессе ретиногенеза - при активации пролонгирует пролиферацию клеток – предшественников, при дезактивации блокирует [12]. Однако есть данные, что Sav1 может инициировать процесс пролиферации взрослых кардиомиоцитов и усиливать регенерацию кардиомиоцитов после инфаркта миокарда [26; 27]. В нашем случае экспрессия Sav1 снизилась.

Снизилась экспрессия генов супрессоров клеточной пролиферации – некдина (Ndn) и фосфатидилинозитола – 5 -фосфата – 4 – киназы (Pip4k2f) и гена супрессора клеточного деления – Fnip1. Увеличилась экспрессия ингибитора орнитин декарбоксилазы (Oaz1), блокирующего синтез полиаминов, ингибирующего процессы клеточной пролиферации и роста [49] в 1,9 раза.

В 2,1 раза увеличилась экспрессия лизоцима (Lyzs), обычно находящегося в «спящем» состоянии [59], и в 2 раза экспрессия гена активатора транскрипции – фактора Hes1 (Hes1), экспрессируемого обычно в клетках – предшественниках и участвующего в регуляции морфогенеза сетчатки, клеточного цикла и клеточной дифференцировки [22].

Снизилась экспрессия генов активаторов транскрипции – Atmin и Lbh – гена, кодирующего LBH транскрипционный активатор и являющегося регулятором дифференциации фоторецепторов через Otx2 [34] и гена спектрина – бета 1 (Spnb1), участвующего в регуляции процессов транскрипции и дифференциации. В отличие от полученных нами данных, на модели кислород-индуцированной ретинопатии было выявлено, что экспрессия гена Spnb1 в сетчатке увеличивается [29].

Снизилась экспрессия Prox1 – транскрипционного фактора, индуцирующего пролиферацию и дифференцировку биполярных, амакринных и горизонтальных клеток сетчатки в период внутриутробного развития. Снизилась экспрессия гена Egr1, который помимо регуляции пролиферативных процессов в эндотелии, являясь транскрипционным фактором, играет важную роль в нейрональной активности и пластичности [31]. Повышение уровня его экспрессии в сетчатке, выявленное на стрептозотоциновой модели сахарного диабета свидетельствует о его роли в активации микроглии [20].

Повысилась экспрессия генов – гистонов (Hist1h2bf, Hist1h2bj) – ядерных белков, ингибирующих транскрипцию РНК в 1,4 раза. На экспериментальной модели кислород – индуцированной ретинопатии было установлено, что в сетчатке снижается экспрессия генов Hist1h2bk, Hist1h2bc, Hist1h2bp, Hist1h2bl, Hist1h2bj, Hist1h2bm, Hist1h2bn [29].

Регуляция процессов трансляции (синтез белка из аминокислот на матрице информационной, матричной РНК) и процессинга РНК (процесс созревания синтезированной на ДНК преРНК и преобразование её в зрелую РНК)

Экспрессия ингибитора трансляции (Gm11961) – антисмысловой РНК увеличилась в 1,8 раза. Действие антисмысловых РНК направлено против функционирования кодирующих (осмысленных) РНК, в связи с этим они получили название антисмысловых (antisense RNA) или micPHK (mRNA interfering complementary RNA - IncRNA). Антисмысловые РНК образуют гибридные комплексы с комплементарными мРНК и препятствуют формированию трансляционного комплекса [69]. Многочисленные IncRNA играют значительную роль в процессе развития сетчатки [17]. Six3os экспрессируется в клетках – предшественниках сетчатки мыши и человека и контролирует экспрессию фактора транскрипции Six3. Подавление его экспрессии приводит к уменьшению количества биполярных клеток и увеличению количества глиальных клеток Мюллера [10; 14; 50; 79; 80]. Gomafu в процессе развития сетчатки регулирует количество формирования амакриновых и глиальных клеток Мюллера [50].

Увеличилась экспрессия гена Prpf19, отвечающего за процессинг PHK в 1,3 раза и одновременно снизилась экспрессия Sentrin/SUMO специфической протеиназы 3 (Senp3), участвующей в созревании рPHK, SUMO модулирует многие пути передачи сигнала (Wnt, цитокины, ростовые факторы, стероидные гормоны) [1].

Снизилась экспрессия генов Pabpn1 и A2bp1, относящихся к классу PHK – связывающих белков, которые соединяются с большим количеством белков – партнеров и практически со всеми мРНК (осуществляют транспорт мРНК в цитоплазму, проверку ее на «значимость» и определяют путь дальнейших преобразований – деградация, трансляция и ее регуляция) [3].

Регуляция процессов трансмембранного переноса белков и микроэлементов

Повысилась экспрессия гена связанного мембранного белка 1 (Tram1) в 1,5 раза, отвечающего за транслокацию (перенос) белков через мембрану.

Увеличилась экспрессия гена, содержащего NIPA-подобный домен 1 (Npal2), отвечающего за трансмембранный перенос малых молекул и гена, отвечающего за ретроградный транспорт эндосом, окислительный стресс и участвующего в формировании аутосомно-доминантной семейной экссудативной витреоретинопатии (Plekhb2) в 1,5 раза.

Снизилась экспрессия гена Bdh2 (в большом количестве экспрессируется в пигментном эпителии, клетках Мюллера и ганглиозных клетках сетчатки)–ингибитора выработки эндогенной 2,5–дигидроксибензойной кислоты, обеспечивающей трансмебранный (плазматическая и митохондриальная мембраны) перенос железа. Железо участвует в метаболизме холестерина в пигментном эпителии сетчатки и играет роль в формировании возрастной макулярной дегенерации. Установлено, что у мышей с дефицитом протеина HFE (гемохроматоз) снижается экспрессия Bdh2 в клетках сетчатки и увеличивается содержание холестерина [11].

Снизилась экспрессия гена Сся, выполняющего шаперонную функцию – несущего ответственность за поставку меди в супероксиддисмутазу (СОД), при снижении экспрессии Сся активность СОД снижается на 70–90%.

Регуляция процесса передачи сигнала (сигналинг)

Увеличилась экспрессия гена миелоидной дифференцировки Myd88 в 1,36. Myd88 является цитозольным адаптерным белком, участвующим в передаче сигнала от всех толл-подобных рецепторов (Toll-like receptor, TLR) за исключением TLR3 [36]. В результате экспериментальных исследований было установлено, что ингибирование Myd88 в пигментном эпителии сетчатки мышей дает положительный результат в лечении сухой формы AMD.

Увеличилась экспрессия гена кальмомодулина 3 (Calm3), кальцийзависимого сигнального белка в 1,29 раза и незначительно повысилась экспрессия генов, связанных с клеточным сигналингом – Wbpil и Smad4.

Регуляция процессов протеолиза (экстраклеточного, цитоплазматического, протеасомного, лизосомального) и гидролиза

Увеличилась экспрессия гена экстраклеточного протеолиза – матричной металлопротеиназы (Mmp3), отвечающей за деградацию внеклеточного матрикса в 2 раза, цитоплазматического протеолиза – убиквилина 1 (Ubqln1) (установлено, что повышает риск развития болезни Альцгеймера) в 1,45 раза и гена протеасомного протеолиза (Psmd6) в 1,36 раза и снизилась экспрессия гена цитоплазматического убиквитин-протеолиза – Ubeo2o.

Протеасомный (убиквитин-протеасомный) протеолиз – это одна из систем внутриклеточной деградации белков, конъюгированных с убиквитином, участвующих во множестве клеточных процессов, включая регуляцию транскрипции, репарацию ДНК, иммунный ответ и апоптоз [5; 6]. Согласно современным представлениям, протеасомы находятся не только в клетке (ядро, цитоплазма), но и во внеклеточном пространстве. Предполагается, что накопление их в межклеточном пространстве связано с необходимостью «расчистки территории» - избавления от накапливающихся во внеклеточном пространстве белков [9; 58]. За протеасомный протеолиз отвечает многочисленное число генов – Psma6, Psma7, Psma6, Psma7, Psma9 и Psmd13.

Увеличилась экспрессия генов, отвечающих за лизосомальный протеолиз – гюкозидазы (Gaa) в 1,95 раза, лизоцима – аутофагия (Lyzs) в 1,7 раза (установлена связь лизоцима с нейродегенеративными заболеваниями сетчатки) и маннозидазы (Man2b1) в 1,6 раза.

Одновременно увеличилась экспрессия генов, ингибирующих протеолиз, ингибитора трансмембранных сериновых протеиназ (Serpinb3a) в 3,1 раза, ингибитора цистеиновых протеиназ (Stfa1 и Wfdc2) в 1,9 раза и ингибитора пептидазы 16 (Pi16) – в 1,8 раза. Снизилась экспрессия гена Ulk1 – индуктора процессов аутофагии. Увеличилась экспрессия гена, отвечающего за цитоплазматический гидролиз (Ndrg3) в 1,7 раза.

Снизилась экспрессия Loc100044692 гена, отвечающего за катаболизм эндогенных альдегидов. Эндогенные альдегиды образуются в процессе перекисного окисления липидов, гликозилирования и окисления радикалов некоторых свободных аминокислот, обладают высокой цитотоксичностью – формируют ковалентно связанные белки - «вторичные цитотоксические мессенджеры» (при взаимодействии альдегидов с аминогруппами лизина формируется липофусцин), которые за счет ингибирования протеолитической активности протеасом (убиквит-зависимый протеолиз) плохо подвергаются протеолизу и накапливаются в клетках, взаимодействуя с мембранами митохондрий тормозят окислительно – восстановительные процессы в дыхательной цепи митохондрий и угнетают тканевое дыхание. К ферментам, катализирующим процесс катаболизма альдегидов, относятся глутатионтрансфераза и альдозоредуктаза, альдегиддегидрогеназа и альдегидредуктаза [2]. Таким образом, в результате снижения экспрессии Loc100044692 нарушается утилизация эндогенных альдегидов.

Регуляция процесса синаптической передачи

Повысилась экспрессия гена Cd63 (трансмембранный белок), отвечающего за экзоцитоз синаптических везикул в 1,43 раза и гена оксистерол-связывающего белка 2 (Osbp2) - одного из ключевых ферментов холестеринового обмена, участвующего в поддержании липидного состава мембран, связывающего оксистеролы и ингибирующего их цитотоксичность в 1,3 раза. Оксистеролы образуются в синаптических мембранах в результате окислительной модификации холестерина, «покидают» мембраны, связываясь с оксистерол-связывающими белками. Увеличилась экспрессия гена Синаптотагмин I (Syt1) – мембранного белка синаптических везикул, отвечающего за синаптическую передачу [57; 63; 32], способствующего аксональному разветвлению [25] и участвующего в регенерации аксонов [68] в 1,24 раза. На модели аксональной травмы (краш-синдром) зрительного нерва мышей было установлено, что после травмы увеличивается экспрессия Syt1, авторы предполагают, что индукция экспрессии Syt1 может быть обусловлена регенеративной недостаточностью [55].

Снизилась экспрессия гена Syap1 – синапс – ассоциированного белка 1, отвечающего за синаптическую передачу и гена Trpm3, играющего важную роль в передаче сигналов во внутренних слоях сетчатки [24; 15].

Регуляция митохондриальных функций

В 1,5 раза увеличилась экспрессия сигнальной митохондриальной пептидазы – ген Sec11a.

Одновременно снизилась экспрессия гена Atp5c1, кодирующего субъединицу митохондриальной $AT\Phi$ – синтазы – катализатора синтеза $AT\Phi$, и гена Atpif1, кодирующего ингибитор митохондриальной $AT\Phi$ – азы – катализатора отщепления от аденозинтрифосфорной кислоты остатков фосфорной кислоты с освобождением энергии, используемой в процессах трансмембранного переноса и биосинтеза различных соединений, что свидетельствует о нарушении энергетического метаболизма.

Снизилась экспрессия гена, ответственного за высокую точность воспроизведения генетически заданной структуры белков – гена, кодирующего митохондриальный фермент – фенилаланил-тРНК синтетазу (Fars2) и снизилась экспрессия гена Chchd1, кодирующего белок миторибосом (рибосом митохондрий).

Регуляция метаболических процессов

Уровень экспрессии гена цитохрома P450 (Сур2а5), отвечающего за процессы окисления, гидроксилирования, метаболизма ретинола (катализатор окисления ретиноевой кислоты в 4–гидрокси-ретиноевую кислоту) повысился в 4,0 раза.

Повысилась экспрессия гена фосфатазы 1 (Ppp1ca) в 1,32 раза, участвующего в регуляции различных метаболических процессов. Установлено, что после экспериментального лигирования центральной артерии сетчатки у крысы увеличивается уровень экспрессии Ppp1ca, Ppp3r1 и Ppp1cc [48].

Увеличилась экспрессия гена орнитинаминотрансферазы (Oat), катализирующей трансаминирование орнитина и альфа-кетоглутарата в пиролин-5-карбоксилат, глутамин или пролин в 1,5 раза; при дефиците орнитин – аминотрансферазы развивается прогрессирующая хорио-ретинальная дистрофия Gyrate [30].

Снизилась экспрессия гена Gldc (декарбоксилаза глицина), катализирующего образование глицина из глиоксилата; увеличивается экспрессия Gldc в ткани сетчатки при стрептозотоциновом сахарном диабете [20].

Регуляция экспрессии факторов роста и стресс-белков (белки острой фазы воспаления)

Снизилась экспрессия гена Ngfrap1 – белка рецептора фактора роста нервов, являющегося низкоаффинным рецептором нейротрофинов (NGF, BDNF, NT3, NT4) и играющего важную роль в регулировке активности нейротрофиновых Trkрецепторов, в частности, TrkA.

Повысился уровень экспрессии лактоферрина (Ltf), который является белком острой фазы воспаления и регулирует функции иммунокомпетентных клеток – в 3,7 раза.

Выводы

Таким образом, при интравитреальном введении VEGF:

• нарушается барьерная функция эндотелия сосудов сетчатки за счет снижения экспрессии генов мембранных белков плотного контакта (Ocln и Cldn -1, -2, -3, -5, -10, -11 и -19), генов, которые относятся к мембранным гликопротеинам (Ррар2b) и отвечают за биосинтез гепарансульфата (Ndst1, Hs3st3a1) - одного из компонентов эндотелиального гликокаликса, поддерживающего функции сосудистой стенки; за счет увеличения экспрессии гена Gp2, снижающего функции эндотелиального барьера и молекул межклеточной адгезии (Icam-1, -2, Vcam-1, CD44, Cx3cl1в); снижение экспрессии гена St3gal6, участвующего в синтезе лиганда клеточной адгезии Е – селектина, вероятно, является компенсаторным;

• меняется экспрессия генов, участвующих в регуляции процесса неоангиогенеза – с одной стороны, компенсаторно увеличивается экспрессия генов – ингибиторов неоваскуляризации (Psen2, Rhbdf1, Tsp1, Igfbp4) и снижается экспрессия генов, стимулирующих ангиогенез – Irs2 и Egr1, с другой стороны, увеличивается экспрессия гена Upp1, обладающего проангиогенными свойствами;

• активируется экспрессия генов из семейства промежуточных цитоскелетных филаментов (Krt 17, Krt 19, Krt 13, Krt 23, Krt 15, Krt 14, Krt 6b), клеточного протектора Muc1 и ядерного фибриллярного белка Lmna, обеспечивающих поддерживающую структурную функцию и снижается экспрессия Capns1, участвующего в деградации белков – компонентов цитоскелета, одновременно при этом снижается экспрессия белков – кристаллинов (Cryga, Crygc, Crygn, Crygf, Cryge), относящихся также к группе структурных генов;

• снижается экспрессия генов – супрессоров клеточной пролиферации (Sav1, Ndn, Pip4k2f, Fnip1) и увеличивается экспрессия гена Oaz1-ингибитора клеточной пролиферации;

• увеличивается экспрессия генов, имеющих отношение к клеточной дифферен-

цировке (Lyzs, Hes1), находящихся обычно во взрослом организме в «спящем» состоянии; блокируются процессы транскрипции за счет снижения экспрессии генов активаторов транскрипции (Atmin, Lbh, Spnb1, Prox1, Egr1) и увеличения экспрессии генов гистонов (Hist1h2bf, Hist1h2bj) – ингибиторов транскрипции;

• увеличивается экспрессия ингибитора трансляции – Gm11961 – антисмысловой РНК и регулируется процесс созревания РНК – увеличивается экспрессия гена Prpf19 и снижается экспрессия Senp3, Pabpn1 и A2bp1c;

• активируется экспрессия генов, отвечающих за трансмембранный перенос белков – Tram1, малых молекул – Npal2, за ретроградный транспорт эндосом – Plekhb2 и снижается экспрессия гена Bdh2 – ингибитора трансмембранного переноса железа (активируется перенос железа) и гена Ссs, отвечающего за поставку меди в СОД (снижается активность фермента);

• активируется процесс передачи сигнала – повышается экспрессия генов – Myd88, Calm3, Wbpil и Smad4;

• увеличивается экспрессия генов, отвечающих за экстраклеточный (Mmp3), цитоплазматический (Ubqln1), протеасомный (Psmd6) и лизосомальный (Gaa, Lyzs, Man2b1) протеолиз и гена, активирующего цитоплазматический гидролиз (Ndrg3); одновременно снижается экспрессия гена, отвечающего за цитоплазматический протеолиз – Ubeo2o, индуктора процессов аутофагии – Ulk1 и увеличивается экспрессия генов, ингибирующих протеолиз – Serpinb3a, Stfa1, Wfdc2, Pi16 и Loc100044692;

• регулируется процесс синаптической передачи – одновременно увеличивается – Cd63, Osbp2, Syt1 и снижается – Syap1, Trpm3 экспрессия генов, отвечающих за синаптическую передачу;

• регулируются митохондриальные функции – увеличивается экспрессия гена сигнальной митохондриальной пептидазы – Sec11a, снижается экспрессия генов митохондриальной АТФ – синтазы – Atp5c1, ингибитора митохондриальной АТФ – азы – Atpif1, фенилаланил-тРНК синтетазы – Fars2 – и гена белка миторибосом Chchd1;

• активируется экспрессия генов, отвечающих за метаболизм – Oat, Ppp1ca и Cyp2a5 (метаболизм ретинола) и снижается экспрессия гена, катализирующего образование глицина – Gldc;

• снижается экспрессия гена Ngfrap1 – белка рецептора фактора роста нервов и повышается уровень экспрессии стрессбелка – лактоферрина (Ltf), регулирующего функции иммунокомпетентных клеток. VEGF, таким образом, помимо того, что играет важную роль в нарушении функции гематоретинального барьера, обладает еще целым рядом эффектов, представление о ко-

торых необходимо иметь на сегодняшний день для повышения эффективности лечения офтальмопатологии, сопровождающейся формированием макулярного отека.

Соотношение экспрессии генов в сетчатке мышей линии C57BL/6J в норме
и при интравитреальном введении VEGF (р <0,01)

Символ	Название	Соот- ношение (Ratio)
1	2	3
LOC100041004 (PSEN2)	Presenilin-2	325
CLDN11	Claudin 11	14,212
CLDN1	Claudin 1	8,205
GP2	Pancreatic zymogen granule membrane protein GP-2	8,074
CD44	CD44 antigen	6,123
ICAM-2	Intercellular adhesion molecule 2	5,233
KRT17	Keratin 17	4,811
CYP2A5	cytochrome P450, family 2, subfamily a, polypeptide 5	4,020
LTF	Lactoferrin	3,758
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein 1	3,215
CX3CL1B	Chemokine (C-X3–C motif) ligand 1 (Fractalkine)	3,243
MUC1	Mucin 1, cell surface associated	3,130
SERPINB3A	Serine peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3A	3,116
KRT19	Keratin 19	2,983
KRT13	Keratin 13	2,680
UPP1	Uridine phosphorylase 1	2,576
KRT23	Keratin 23 (histone deacetylase inducible)	2,477
CLDN19	Claudin 19	2,333
KRT15	Keratin 15	2,296
KRT14	Keratin 14	2,239
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1	2,151
LYZ	Lysozymes	2,149
MMP3	Matrix metallopeptidase 3	2,042
HES1	Transcription factor HES1 (hairy and enhancer of split-1)	2,011
GAA	Acid alpha-glucosidase	1,952
WFDC2	WAP (whey acidic protein)four-disulfide core domain protein 2	1,904
STFA1	Stefin A1	1,868
LOC100045697 (OAZ1)	Ornithine decarboxylase antizyme	1,859
PI16	Peptidase inhibitor 16	1,810
OTTMUSG0000005065	syn. Gm11961 (antisense lncRNA gene)	1,768
CAPNS1	Calpain small subunit 1	1,751
LYZS	LysozymeS	1,711
C130090K23RIK	RIKEN к ДНК С130090К23 gene	1,692
NDRG3	N-myc downstream-regulated gene 3 protein	1,678
CLDN2	Claudin 2	1,613
MAN2B1	Mannosidase alpha class 2B member 1	1,564
NPAL2	NIPA-Like Domain Containing 2	1,541
PLEKHB2	Pleckstrin homology domain-containing family B member 2	1,523
TRAM1	Translocation associated membrane protein 1	1,521
KRT6B	Keratin 6B	1.494

Продолжение табл.

1	2	3
LMNA	Lamin A	1,475
SEC11A	SEC11 Homolog A, Signal Peptidase Complex Subunit	1,468
OAT	Ornithine aminotransferase	1,467
RHBDF1	Inactive rhomboid protein 1 (iRhom1)	1,463
UBQLN1	Ubiquilin 1	1,453
HIST1H2BF	Histone Cluster 1,H2bf	1,440
CD63	CD63 antigen	1,427
HIST1H2BJ	Histone Cluster 1,H2bj	1,415
PSMB6	Proteasome subunit beta type-6 (subunit beta-1)	1,365
MYD88	Myeloid differentiation primary response gene 88	1,364
PPP1CA	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform	1,321
PRPF19	Pre-mRNA-processing factor 19	1,306
CALM3	Calmodulin 3	1,294
OSBP2	Oxysterol-binding protein 2	1,294
OCLN	Occludin	1,259
CLDN10	Claudin 10	1,251
CLDN3	Claudin -3	1,248
SYT1	Synaptotagmin I	1,239
IGFBP4	Insulin-like growth factor-binding protein 4	1,236
TSP1	Thrombospondin-1	1,228
D19WSU162E (WBP1L)	WW domain binding protein 1-like	1,181
CLDN5	Claudin 5	1,173
LOC100048076 (Smad4)	Similar to MAD (Mothers against decapentaplegic) homolog 4	0,805
PPAP2B	Lipid phosphate phosphohydrolase 3	-1,487
HNRPL	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein L	-1,139
LOC100044692	Similar to aldehyde reductase	-1,139
PABPN1	Polyadenylate-binding nuclear protein 1	-1,131
NDN	Necdin	-1,127
ATP5C1	ATP synthase	-1,126
ATPIF1	ATPase inhibitory factor 1	-1,126
SAV1	Salvador homolog 1	-1,122
SYAP1	Synapse-associated protein 1	-1,110
PIP4K2A	Phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase type-2 alpha	-1,110
CHCHD1	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 1	-1,109
ATMIN	ATM Interactor	-1,105
ACD	Adrenocortical dysplasia protein homolog	-1,100
SENP3	Sentrin/SUMO (Small ubiquitin-like modifier)-specific protease 3	-0,993
NGFRAP1	Nerve growth factor receptor	-0,991
D9ERTD392E	D9ERTD392E, syn. CCPG1 – cell cycle progression 1	-0,979
LBH	Limb bud and heart development (LBH-like)	-0,976
FARS2	Phenylalanyl-tRNA synthetase	-0,970
SPNB1	Spectrin beta 1	-0,968
FNIP1	Folliculin Interacting Protein 1	-0,965
A2BP1	Ataxin 2–binding protein 1	-0,955
ULK1	Serine/threonine-protein kinase	-0,945
TXNDC15	Thioredoxin domain-containing protein 15	-0,943
EGR1	Early growth response protein 1	-0,938
CCS	Copper chaperone for superoxide dismutase	-0,937
COL6A1	Collagen alpha-1(VI) chain	-0,932
4933407N01RIK	RIKEN cDNA 4933407N01 gene	-0,929

1	2	3
BDH2	3 Hydroxybutyrate Dehydrogenase, type 2	-0,892
NDST1	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 1	-0,889
LOC216443	Methionyl-tRNA synthetase	-0,874
HS3ST3A1	Heparan sulfate-glucosamine 3-sulfotransferase 3A1	-0,869
UBE2O	Ubiquitin-conjugating enzyme E2O	-0,860
ST3GAL6	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6	-0,860
RGS7BP	Regulator of G-protein signaling 7 binding protein	-0,855
PPP1R1A	Protein phosphatase 1 regulatory inhibitor subunit 1A	-0,854
GLDC	Glycine Dehydrogenase	-0,847
IRS2	Insulin receptor substrate 2	-0,826
TRPM3	Transient receptor potential cation channel subfamily Member 3	-0,817
LOC100047934	Hhypothetical protein LOC100047934	-0,814
PROX1	Prospero homeobox protein 1	-0,738
2310067B10RIK	RIKEN cDNA 2310067B10 gene (syn. TMEM94)	-0,696
CRYGC	Crystallin, gamma C	-0,676
CRYGF	Crystallin, gamma F	-0,578
GM129	CIART, circadian associated repressor of transcription	-0,566
TRIB3	Tribbles homolog 3	-0,549
CRYGA	Crystallin, gamma A	-0,567
CRYGE	Crystallin, gamma E	-0,543
CRYGN	Crystallin, gamma N	-0,536

Окончание табл.

Список литературы

1. Сорокин А.В., Ким Е.Р., Овчинников Л.П. Протеасомная система деградации и процессинга белков // Успехи и процессинга биологической белков химии. – 2009. – Т. 49. – С. 3–76.

2. Давыдов В.В., Божков А.И. Метаболизм эндогенных альдегидов: Участие в реализации повреждающего действия оксидативного стресса // Биомедицинская химия. – 2003. – Т. 49. – №4. – С.374–387.

 Елисеева И.А., Лябин Д.Н., Овчинников Л.П. Поли (А)-связывающие белки: строение, функции и регуляция // Успехи биологической химии. 2013. – Т.53. – С. 3–343.

 Кожевникова О.С. Изменения транскриптома сетчатки крыс ОХҮЅ с возрастом при развитии ретинопатии: дисс. канд.биол.наук. – Новосибирск, 2014. – 157с.

5. Моисеева Т.Н., Миттенберг А.Г., Барлев Н.А.2010а. Протеасомы и их роль в регуляции транскрипции // Цитология. – 2010. – Т.52, №3 – С.195–203.

6. Цимоха А.С. Протеасомы: участие в клеточных процессах// Цитология. – 2010. – Т.52., №4. – С.277–300

7. Ahmad I., Balasubramanian S., Carolina B., Debbio D. et al. Regulation of Ocular Angiogenesis by Notch Signaling: Implications in Neovascular Age-Related Macular Degeneration Investigative. Ophthalmology & Visual Science. – 2011. – Vol. 52. – No 6, P. 2868–2878

8. Ahmed F., Brown K.M., Stephan D.A., Morrison J.C., Johnson E.C., Tomarev S.I. Microarray analysis of changes in mRNA levels in the rat retina after experimental elevation of intraocular pressure. Invest Ophthalmol Vis Sci., 2004, No 45, P. 1247–1258.

9. Albright J.M., Romero J., Saini V., Sixt S.U., Bird M.D., Kovacs E.J., Gamelli R.L., Peters J., Majetschak M. Proteasomes in human bronchoalveolar lavage fluid after burn and inhalation injury. J. Burn. Care Res., 2009, no. 30, pp. 948–956.

10. Alfano G., Vitiello C., Caccioppoli C., Caramico T., Carola A., Szego M.J., et al. Natural antisense transcripts associated with genes involved in eye development. Hum. Mol. Genet., 2005, Vol.14, P. 913–923.

11. Ananth S., Gnana-Prakasam J.P., Bhutia Y.D., Veeranan-Karmegam R. et al. Regulation of the cholesterol efflux transporters ABCA1 and ABCG1 in retina in hemochromatosis and by the endogenous siderophore 2,5–dihydroxybenzoic acid. Biochim Biophys Acta, 2014, Vol. 1842, No 4, P. 603–612.

12. Asaoka Y., Hata S., Namae M., Furutani-Seiki M., Nishina H. The Hippo Pathway Controls a Switch between Retinal Progenitor Cell Proliferation and Photoreceptor Cell Differentiation in Zebrafish. PLoS ONE, 2014, Vol. 9, No 5, P. e97365.

13. Binz N., Graham C.E., Simpson Ken, Lai K.Y., Shen W., Lai C., Speed T.P., Rakoczy P.E., Long-term effect of therapeutic laser photocoagulation on gene expression in the eye. FASEB J., 2006, Vol. 20, P. 383–385.

14. Blackshaw S., Harpavat S., Trimarchi J., Cai L., Huang H., Kuo W.P. et al. Genomic analysis of mouse retinal development. PLoS Biol., 2004, Vol. 2, P. e247

15. Brown R.L., Xiong W.H., Peters J.H., Tekmen-Clark M., Strycharska-Orczyk I., Reed B.T., Morgans C.W., Duvoisin R.M. TRPM3 expression in mouse retina. PLoS One, 2015, Vol.10, No 2, P e0117615

16. Chinwalla A.T., Cook L.L., Delehaunty K.D., Fewell G.A., Fulton L.A. et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. Nature, 2005, Vol. 420, P. 520–562.

17. Clark B.S., Blackshaw S. Long non-coding RNAdependent transcriptional regulation in neuronal development and disease. Front Genet., 2014, Vol. 5, P. 164.

18. Deissler H., Deissler H., Lang S., Lang G.E. VEGFinduced effects on proliferation, migration and tight junctions are restored by ranibizumab (Lucentis) in microvascular retinal endothelial cells. Br J Ophthalmol., 2008, Vol. 92, No 6, P. 839–43.

19. Deissler H.L., Deissler H., Lang G.K., Lang G.E. VEGF but not PIGF disturbs the barrier of retinal endothelial cells. Exp Eye Res., 2013, Vol. 115, P. 162–171.

20. Freeman W.M., Bixler G.V., Brucklacher R.M., Walsh E., Kimbal S.R., Jefferson L.S., Bronson S.K. Transcriptomic comparison of the retina in two mouse models of diabetes. J Ocul Biol Dis Infor., 2009 Dec, Vol 2., No 4, P. 202–213.

21. Fujikawa M., Sawada O., Miyake T., Kakinoki M., Sawada T., Kawamura H., Ohji M. Correlation between vascular endothelial growth factor and nonperfused areas in macular edema secondary to branch retinal vein occlusion. Clin Ophthalmol., 2013, Vol. 7, P. 1497–1501.

22. Furukawaa T., Mukherjee S., Bao Z., Morrow E.M., Constance L. Cepko, rax, Hes1, and notch1 Promote the Formation of Müller Glia by Postnatal Retinal Progenitor Cells. Neuron, 2000, Vol. 26, No 2, P. 383–394

23. Gardner T.W., Antonetti D.A., Barber A.J., LaNoue K.F., Levison S. W., Diabetic retinopathy: more than meets the eye, Survey of Ophthalmology, 2002, vol. 47, sup. 2, pp. S253–S262.

24. Gilliam J.C., Wensel T.G. TRP channel gene expression in the mouse retina. Vision Res. 2011, Vol.51, No 23–24, P. 2440–52.

25. Greif K.F., Asabere N., Lutz G.J., Gallo G. Synaptotagmin-1 promotes the formation of axonal filopodia and branches along the developing axons of forebrain neurons. Dev Neurobiol., 2013, Vol.73, No 1, P. 27–44

26. Heallen T., Zhang M., Wang J., Bonilla-Claudio M., Klysik E., Johnson R.L., Martin J.F. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. Science, 2011, Vol. 332, No 6028, P. 458–61.

27. Heallen T., Morikawa Y., Leach J., Tao G., Willerson J.T., Johnson R.L., Martin J.F. Hippo signaling impedes adult heart regeneration. Development, 2013, Vol. 140, P. 4683–4690.

28. Heise E.A., Marozas L.M., Grafton S.A., Green K.M., Kirwin S.J., Fort P. E. Strain-Independent Increases of Crystallin Proteins in the Retina of Type 1 Diabetic Rats. PLOS ONE, 2013, Vol. 8, No 12, P. e82520

29. Ishikawa K., Yoshida S., Kadota K., Nakamura T., Niiro H., Arakawa S., et al. Gene Expression Profile of Hyperoxic and Hypoxic Retinas in a Mouse Model of Oxygen-Induced Retinopathy. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2010, Vol.51, P. 4307–4319.

30. Kim S.J., Lim D.H., Kim J.H., Kang S.W. Gyrate atrophy of the choroid and retina diagnosed by ornithine- δ -aminotransferase gene analysis: a case report. Korean J Ophthalmol., 2013, Vol. 27, No 5, P. 388–91.

31. Knapska E., Kaczmarek L. A gene for Neuronal Plasticity in the Mammalian. Prog Neurobiol., 2004, Vol.74, No 4, P. 183–211.

32. Kochubey O., Lou X., Schneggenburger R. Regulation of transmitter release by Ca(2+) and synaptotagmin: insights from a large CNS synapse. Trends Neurosci., 2011, Vol.34, No 5, P. 237–246.

33. Lal-Nag M., Morin P.J. The claudins. Genome Biol., 2009, Vol. 10, P. 235.

34. Li W., Zhou L., Li Z., Wang Y., Shi J., Yang Y., Gu J. Zebrafish Lbh-like Is Required for Otx2–mediated Photoreceptor Differentiation. Int J Biol Sci., 2015, Vol. 11, No 6, P. 688–700.

35. Lofqvist C., Willett K.L., Aspegren O., Smith A.C.H., Aderman C.M., Connor K.M., Chen J., Hellstrom A., Smith L.E.H.Quantification and Localization of the IGF/Insulin System Expression in Retinal Blood Vessels and Neurons during Oxygen-Induced Retinopathy in Mice. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2009, Vol. 50, No. 4, P. 1831–1837.

36. Lu Y.C., Yeh W.C., Ohashi P.S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine, 2008, Vol. 42, No 2, P. 145-51.

37. Lucerna M., Mechtcheriakova D., Kadl A., Schabbauer G., Schäfer R., Gruber F., Koshelnick Y., Müller H.D., Issbrücker K., Clauss M., Binder B.R., Hofer E. NAB2, a corepressor of EGR-1, inhibits vascular endothelial growth factor-mediated gene induction and angiogenic responses of endothelial cells. J Biol Chem., 2003, Vol. 278, No 13, P. 11433–40.

38. Lukiw W.J., Gordon W.C., Rogaev E.I., Thompson H., Bazan N.G. Presenilin-2 (PS2) expression up-regulation in a model of retinopathy of prematurity and pathoangiogenesis. Neuroreport., 2001, Vol.12, No 1, P. 53–7.

39. Luo Y., Xiao W., Zhu X., Mao Y., Liu X., Chen X., Huang J., Tang S., Rizzolo L.J. Differential Expression of Claudins in Retinas during Normal Development and the Angiogenesis of OxygenInduced Retinopathy. IOVS, 2011, Vol. 52, No. 10, P. 7556–7564.

40. Meyer-Schwickerath R., Pfeiffer A., BlumW.F. et al. Vitreous levels of the insulin-like growth factors I and II, and the insulin-like growth factor binding proteins 2 and 3, increase in neovascular eye disease: studies in nondiabetic and diabetic subjects. J Clin Invest. 1993, Vol. 92, P. 2620–2625.

41. Miyamoto K., Khosrof S., Bursell S. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Induced Retinal Vascular Permeability Is Mediated by Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1). American Journal of Pathology, 2000, Vol. 156, No. 5, P. 1733–1739.

42. Overgaard C.E., Daugherty B.L., Mitchell L.A., Koval M. Claudins: control of barrier function and regulation in response to oxidant stress. Antioxid Redox Signal. 2011, Vol. 15, P. 1179–1193.

43. Panchatcharam M., Salous A.K., Brandon J. et al. Mice With Targeted Inactivation of Ppap2b in Endothelial and Hematopoietic Cells Display Enhanced Vascular Inflammation and Permeability. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2014, Vol. 34, No 4, P. 837–845.

44. Peng S., Adelman R.A., Rizzolo Lawrence J. Minimal Effects of VEGF and Anti-VEGF Drugs on the Permeability or Selectivity of RPE Tight Junctions. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010, Vol. 51, No 6, P. 3216–3225.

45. Penn J.S., Madan A., Caldwell R. B., Bartoli M., Caldwell R.W., Hartnett M.E. Vascular endothelial growth factor in eye disease, Progress in Retinal and Eye Research, 2008, Vol. 27, No 4, P. 331–371.

46. Pfeiffer A., Spranger J., Meyer-Schwickerath R., Schatz H. Growth factor alterations in advanced diabetic retinopathy: a possible role of blood retina barrier breakdown. Diabetes. 1997, Vol. 46, P. S26–S30.

47. Piri N., Song M., Kwong J.M., Caprioli J. Modulation of alpha and beta crystallin expression in rat retinas with ocular hypertension-induced ganglion cell degeneration. Brain Res. 2007, Vol. 1141, P. 1–9.

48. Prasad S.S., Kojic L., Wen Y.H., Chen Z., Xiong W., Jia W., Cynader M.S. Retinal gene expression after central retinal artery ligation: effects of ischemia and reperfusion. Invest Ophthalmol Vis Sci., 2010, Vol. 51, No 12, P. 6207–19.

49. Rajput B., Murphy T. D., Pruitt K.D. RefSeq curation and annotation of antizyme and antizyme inhibitor genes in vertebrates. Nucleic Acids Res., 2015, Vol. 43, No 15, P. 7270–7279.

50. Rapicavoli N.A., Poth E.M., Zhu H., Blackshaw S. The long noncoding RNA Six3OS acts in trans to regulate retinal development by modulating Six3 activity. Neural Dev., 2011, Vol. 6, P. 32.

51. Sakaguchi H., Miyagi M., Darrow R.M., Crabb J.S., Hollyfield J.G., Organisciak D.T., Crabb J.W. Intense light exposure changes the crystallin content in retina. Exp Eye Res., 2003, Vol. 76, P. 131–133.

52. Sassa Y., Hata Y., Murata T., Yamanaka I., Honda M., Hisatomi T., Fujisawa K., Sakamoto T., Kubota T., Nakagawa K., Sueishi K., Ishibashi T. Functional role of Egr-1 mediating VEGF-induced tissue factor expression in the retinal capillary endothelium.Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol., 2002, Vol. 240, No 12, P. 1003–10.

53. Scheppke L., Aguilar E., Gariano R.F., Jacobson R., Hood J., Doukas J., Cao J., Noronha G., Yee S. et al. Retinal vascular permeability suppression by topical application of a novel VEGFR2/Src kinase inhibitor in mice and rabbits. J Clin Invest., 2008, Vol. 118, No 6, P. 2337–2346.

54. Serra A.M., Waddell J., Manivannan A., Xu H., Cotter M., Forrester J.V. CD11b+ bone marrow-derived monocytes are the major leukocyte subset responsible for retinal capillary leukostasis in experimental diabetes in mouse and express high levels of CCR5 in the circulation. Am J Pathol., 2012, Vol. 181, P. 719 – 727.

55. Sharma T.P., McDowell C.M., Liu Y., Wagner A.H., Thole D., Faga B.P., Wordinger R.J., Braun T.A., Clark AF. Optic nerve crush induces spatial and temporal gene expression patterns in retina and optic nerve of BALB/cJ mice. Mol Neurodegener., 2014, Vol. 9, P. 14.

56. Shin E.S., Sorenson C.M., Sheibani N. Diabetes and retinal vascular dysfunction // Journal of Ophthalmic and Vision Research, 2014, Vol. 9, No. 3, P. 362–373.

57. Singec I., Knoth R., Ditter M., Hagemeyer C.E., Rosenbrock H., Frotscher M., Volk B. Synaptic vesicle protein synaptoporin is differently expressed by subpopulations of mouse hippocampal neurons. J Comp Neurol., 2002, Vol. 452, No 2, P. 139–53.

58. Sixt S.U., Peters J. Extracellular alveolar proteasome: possible role in lung injury and repair. Proc. Amer. Thorac., 2010, Soc. 7, P. 91–96.

59. Solovei1 I., Kreysing M., Lanctôt C. et al. Nuclear Architecture of Rod Photoreceptor Cells Adapts to Vision in Mammalian Evolution. Cell, 2009, Vol. 137, No 2, P. 356–368.

60. Spranger J., Buhnen J., Jansen V. et al. Systemic levels contribute significantly to increased intraocular IGF-I, IGF-II and IGF-BP3 [correction of IFG-BP3] in proliferative diabetic retinopathy. Hormone Metab Res., 2000, Vol. 32, P. 196–200.

61. Steele M.R., Inman D.M., Calkins D.J., Horner P.J., Vetter M.L. Microarray analysis of retinal gene expression in the DBA/2J model of glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006, Vol. 47, P. 977–985.

62. Suarez S., McCollum G.W., Bretz C.A., Yang R., Capozzi M.E., Penn J.S. Modulation of VEGF-induced retinal vascular permeability by peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ . Invest Ophthalmol Vis Sci., 2014, Vol. 55, P. 8232–8240.

63. Sun T., Xiao H.S., Zhou P.B., Lu Y.J., Bao L., Zhang X. Differential expression of synaptoporin and synaptophysin in primary sensory neurons and up-regulation of synaptoporin after peripheral nerve injury. Neuroscience, 2006, Vol. 141, No 3, P. 1233–45.

64. Suzuma K., Takagi H., Otani A., Oh H., Honda Y. Expression of Thrombospondin-1 in Ischemia-Induced Retinal Neovascularization. Am J Pathol. 1999, Vol. 154, No 2, P. 343–354.

65. Tarr J.M., Kaul K., Chopra M., Kohner E.M., Chibber R., Pathophysiology of diabetic retinopathy, ISRN Ophthalmology, 2013, P. 1–13.

66. Templeton J.P., Wang X.D., Freeman N.E., Ma Z., Lu A., Hejtmancik F., Geisert E.E., A Crystallin Gene Network in the Mouse Retina. Exp Eye Res., 2013, Vol. 116, P. 129–140.

67. Uehara F., Yanagita T., Iwakiri N., Ohba N. Immunohistochemical localization of MUC1 glycoprotein in the retina. Jpn J Ophthalmol., 1997, Vol. 41, P. 200–201. 68. Vennekate W., Schroder S., Lin C.C., van den Bogaart G., Grunwald M., Jahn R., Walla P.J. Cis- and transmembrane interactions of synaptotagmin-1. Proc Natl Acad Sci U S A., 2012, Vol. 109, No 27, P. 11037–11042.

69. Villegas V.E., Zaphiropoulos P.G. Neighboring gene regulation by antisense long non-coding RNAs. Int J Mol Sci., 2015, Vol. 16, No 2, P. 3251–66.

70. Wang S., Du S., Wu Q. et al. Decorin Prevents Retinal Pigment Epithelial Barrier Breakdown Under Diabetic Conditions by Suppressing p38 MAPK Activation. Invest Ophthalmol Vis Sci., 2015, Vol. 56, P. 2971–2979.

71. Wesolowski E., Han V.K. Expression of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) genes in a mouse model of retinal neovascularization. Pediatric Research, 1997, Vol. 41, P. 187–187.

72. Wilson A.S., Hobbs B.G., Shen W.Y., Speed T.P., Schmidt U., Begley C.G., Rakoczy P.E. Argon laser photocoagulation-induced modification of gene expression in the retina. Invest Ophthalmol Vis Sci., 2003, Vol. 44, P. 1426–1434.

73. Xi J., Farjo R., Yoshida S., Kern T.S., Swaroop A., Andley U.P. A comprehensive analysis of the expression of crystallins in mouse retina. Mol Vis., 2003, Vol. 9, P. 410–419.

74. Xianjin Y., Schubert M., Peachey N. S., Suzuma K., Burks D.J., Kushner J.A. et al Insulin Receptor Substrate 2 Is Essential for Maturation and Survival of Photoreceptor Cells. The Journal of Neuroscience, 2005, Vol. 25, No 5, P. 1240–1248.

75. Xu H., Dawson R., Crane I.J., Liversidge J. Leukocyte Diapedesis In Vivo Induces Transient Loss of Tight Junction Protein at the Blood–Retina Barrier. Invest Ophthalmol Vis Sci., 2005, Vol. 46, No 7, P. 2487–2494.

76. Xu Q., Qaum T., Adamis A.P. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. Invest Ophthalmol Vis Sci., 2001, Vol. 42, No 3, P. 789–94.

77. Yanagi Y., Tamaki Y., Inoue Y., Obata R., Muranaka K., Homma N. Subconjunctival Doxifluridine Administration Suppresses Rat Choroidal Neovascularization through Activated Thymidine Phosphorylase Investigative Ophthalmology & Visual Science February 2003, Vol.44, P. 751–754.

78. You J.J., Yang C.H., Huang J.S., Chen M.S., Yang C.M. Fractalkine, a CX3C chemokine, as a mediator of ocular angiogenesis. Invest Ophthalmol Vis Sci., 2007, Vol. 48, P. 5290–5298.

79. Zhao X., Tang Z., Zhang H., Atianjoh F.E., Zhao J.Y., Liang L, et al. A long noncoding RNA contributes to neuropathic pain by silencing Kcna2 in primary afferent neurons. Nat. Neurosci., 2013, Vol. 16, No 8, P. 1024–31.

80. Zhu D., Lai Y., Shelat P.B., Hu C., Sun G.Y., Lee J.C. Phospholipases A2 mediate amyloid-beta peptideinduced mitochondrial dysfunction. J. Neurosci., 2006, Vol. 26, No 43, P. 11111–9.