

## ІНГІБУВАННЯ РЕАКТИВНОГО ГЛІОЗУ В СІТКІВЦІ ЩУРІВ ІЗ СТРЕПТОЗОТОЦИНІНДУКОВАНИМ ДІАБЕТОМ ПІД ДІЄЮ ГІДРАТОВАНОГО C<sub>60</sub>-ФУЛЕРЕНУ

Надійшла 21.10.15

Реактивний гліоз є ключовим патогенетичним фактором виникнення ретинопатії у пацієнтів із цукровим діабетом; ця патологія індукується метаболічними розладами та розвитком окисного стресу в сітківці. Фулерен C<sub>60</sub> та деякі його водорозчинні похідні відомі як виключно потужні антиоксиданти, здатні проявляти нейропротекторні властивості при наявності широкого спектра патологій та несприятливих впливів. Ми вперше досліджували вплив введення гідратованої форми фулерену C<sub>60</sub> (C<sub>60</sub>HyFn) на вміст і поліпептидний склад гліального фібрилярного кислого протеїну (ГФКП) у сітківці щурів з експериментальним діабетом, індукованим стрептозотоцином (СТЗ). Застосування методики імуноблотингу дозволило виявити, що рівень ГФКП у сітківці щурів із діабетом перевищує контрольні значення більш ніж у два рази ( $P < 0.01$ ). Це вказувало на реактивацію ретинальних гліальних клітин в умовах гіперглікемії. Підвищення ГФКП-імунореактивності, пов'язане з розвитком реактивного гліозу в сітківці щурів із діабетом, було також підтверджено імуногістохімічно. Споживання діабетичними щурами розчину C<sub>60</sub>HyFn (60 нМ) з питною водою протягом 12 тижнів призводило до істотної нормалізації вмісту ГФКП (зниження на 42 %;  $P < 0.05$ ). Крім того, дія C<sub>60</sub>HyFn зумовлювала вірогідне (майже на 37 %) зниження концентрації глікозильованого гемоглобіну в сироватці крові щурів із СТЗ-діабетом, не змінюючи при цьому рівень інсуліну та глюкози в крові діабетичних тварин. Отримані результати свідчать про те, що протекторна дія гідратованого фулерену в умовах діабетичної ретинопатії на початкових стадіях її розвитку реалізується через пригнічення ним надмірної активації гліоцитів сітківки.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** цукровий діабет, діабетична ретинопатія, реактивний гліоз, гліальний фібрилярний кислий протеїн (ГФКП), глікозильований гемоглобін, гідратований C<sub>60</sub>-фулерен.

### ВСТУП

Діабетична ретинопатія (ДР) – це комплексне мікроциркуляторне захворювання сітківки; вона розвивається внаслідок порушень метаболізму, індукованих гіперглікемією в умовах як інсулінзалежного, так і інсуліннезалежного діабету. ДР призводить до швидкого розвитку дегенераційних процесів у сітківці. Ретинальна нейродегенерація проявляється ще до того, як мо-

жуть бути визначені мікроциркуляторні порушення при офтальмологічному обстеженні [1]. Тому виявлення механізмів, що призводять до нейродегенеративних змін у сітківці на ранній стадії ДР, є важливим для розробки відповідних терапевтичних підходів.

У наш час відбувається істотне зростання захворюваності на цукровий діабет. За оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), кількість пацієнтів у світі, що страждають на діабет різних типів, у 2025 р. сягне 380 мільйонів [2]. Ретинопатії є найбільш поширеними ускладненнями цукрового діабету; ризик розвитку ушкоджень сітківки різного ступеня важкості за 10 років після діагностування діабету виявляється більш ніж у 60 % обстежених пацієнтів [3].

<sup>1</sup>Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара (Україна).

<sup>2</sup> Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ (Україна).

<sup>3</sup>Бінгол університет, Бінгол (Туреччина).

Ел. пошта: nedzvetskyvictor@ukr.net (В. С. Недзвєцький);  
prishepka89@mail.ru (І. В. Прищєпа);  
gbaydas@bingol.edu.tr (Г. Байдаш).

Ранні діабетичні порушення в сітківці можуть бути результатом активації різних патологічних процесів, які модулюють характеристики загальних видів клітинних відповідей – апоптозу, запалення та окисного стресу [1]. Окисний стрес впливає на широке коло біохімічних процесів, регуляцію активності метаболічних шляхів та багато клітинних функцій. Слід чекати, що комплексний аналіз патогенетичних феноменів в умовах ушкоджень клітин сітківки допоможе розкрити молекулярні механізми патології таких порушень та сприяє розробці відповідних нейропротекторних засобів.

Одним із головних феноменів при ДР є розвиток окисного стресу та пов'язаних з ним метаболічних порушень. Високий рівень аеробного метаболізму в нервових клітинах зумовлює значну вірогідність аномальної інтенсифікації процесу генерації вільних радикалів. Зокрема, це відбувається в умовах гіперглікемії. Клітини нервової тканини дуже чутливі до ушкоджуючої дії вільних радикалів, оскільки в даних клітинах наявна велика кількість поліненасичених жирних кислот, а система антиокислювального захисту є відносно слабкою. Дослідження патологічних змін при розвитку ДР тривалий час були зосереджені на мікроциркуляторному та нейронному аспектах цього захворювання [4]. Незважаючи на численні дані щодо провідної ролі змін у гліальних клітинах у патогенезі ДР, механізми аномальної активації гліоцитів, індукованої гіперглікемією, а також порушення нейрон-гліальних та гліально-судинних взаємодій у відповідних умовах залишаються поки що до кінця не розкритими.

Відомо, що гліальні клітини забезпечують структурну та метаболічну підтримку нейронів та кровоносних судин сітківки ока. Встановлено, що деякі дегенеративні процеси в нервовій тканині сітківки запускаються майже відразу після початку розвитку діабету, проте реактивність астроцитів та клітин Мюллера сітківки у щурів істотно підвищується лише приблизно через три місяці після індукції експериментального діабету [1]. Одним із найбільш визнаних маркерів функціонального стану гліальних клітин (насамперед астроцитів) є гліальний фібрилярний кислий протеїн (ГФКП). Мономерні субодиниці проміжних філаментів цитоскелета астроцитів складаються з фібрилізованої водонерозчинної форми цього білка. Відповідь гліальних клітин на впливи різних за природою чинників проявляється у проліферації та гіпертрофії астроцитів,

що пов'язано зі зростанням експресії ГФКП. Такі прояви є типовою реактивною відповіддю; вони отримали назву «астрогліоз». Деякі ушкоджуючі фактори, проте, викликають зміни в астроцитах, істотно відмінні від таких стереотипної відповіді [5]. Зміни функцій глії можуть являти собою істотну причину нейродегенерації та порушення функцій кровоносних судин сітківки на ранніх стадіях розвитку ДР.

Гліальні клітини виконують трофічну функцію щодо нейронів та гангліозних клітин, відіграючи роль посередника між ними та клітинами ендотелію судин. Крім того, ретиноглія в умовах розвитку різних нейропатологій та дії ушкоджуючих чинників є значною мірою відповідальною за репаративні процеси. Клітини астроглії експресують широкий спектр нейротропних факторів та цитокінів, що забезпечує певний ступінь захисту нейронів від нейротоксичного впливу вільних радикалів. На сьогодні відомо, що антиоксидантні спроможності астроцитів значно потужніші, ніж такі у нейронів [6]. З урахуванням цих фактів саме астроцити розглядають як головні протектори нейронів від ушкоджуючої дії оксидативного стресу.

ДР є основною причиною втрати зору серед людей віком від 20 до 74 років; отже, пошук ефективних неінвазивних підходів, спрямованих на корекцію даного ускладнення, є актуальним медико-соціальним завданням. Для попередження та обмеження нейродегенеративних змін у разі ДР було запропоновано використання низки різних за природою агентів, що мають антиоксидантні властивості. Протекторна дія таких антиоксидантів сприяє виживанню астроцитів, стабілізації їх морфології та частковому відновленню порушеної діяльності нервових елементів [7].

Протягом останніх років активно досліджуються цитопротекторні ефекти гідратованої форми фулерену  $C_{60}$  ( $C_{60}H_nF_n$ ) в умовах різних нейродегенеративних станів, у тому числі асоційованих із діабетом [8]. Фулерени є третьою алотропною формою вуглецю. Їх наночастки мають унікальну структуру та характеризуються особливими біологічними властивостями. Зокрема, показано, що  $C_{60}H_nF_n$  здатний ефективно пригнічувати запальні процеси [9].

Існують непрямі, але досить переконливі вказівки на те, що дослідження антиоксидантів, спроможних гальмувати відповідні ушкодження і запальну реакцію, є перспективними для пошуку шляхів

попередження розвитку діабетичних ушкоджень сітківки. У щурів з експериментально індукованим діабетом була продемонстрована ефективність фулерену  $C_{60}$  щодо збереження статевих функцій у самців [10]. Виявилось, що фулерен має високий терапевтичний потенціал в умовах гіперпродукції вільних радикалів та мітохондріальних ушкоджень [11]. У разі інтоксикації щурів тетрахлоридом вуглецю пероральне введення розчину  $C_{60}$  у значній мірі запобігало розвитку жирової дистрофії печінки та подовжувало тривалість життя тварин [12]. У той же час можливість використання фулерену та його похідних для корекції пошкоджень сітківки, індукованих діабетом, поки що залишалася поза увагою і не піддавалася прямому дослідженню.

У нашій роботі ми визначали впливи розчину гідратованого  $C_{60}$ -фулерену на стан гліальних клітин сітківки та ключові біохімічні показники ретинальної тканини в умовах експериментального діабету у щурів.

## МЕТОДИКА

Стрептозотоциніндукований діабет (СТЗД) широко використовується як адекватна модель для вивчення нейродегенеративних змін в умовах порушення механізмів утилізації глюкози.

Наші експерименти було проведено на щурах лінії Вістар (статевозрілих самцях віком 11–12 тижнів), отриманих із віварію ДНУ ім. Олесея Гончара. Тварин утримували в умовах постійної температури ( $22 \pm 2.0$  °C) і контрольованої тривалості світлового дня (12/12-годинний цикл). Вода та їжа були доступні тваринам *ad libitum*.

Після семи діб акліматизації тварини були рандомізовано поділені на чотири групи ( $n = 6$  у кожній групі) – контрольну інтактну (К), контрольну «фулеренову» (тварини отримували розчин  $C_{60}$ -HyFn), групу щурів із СТЗД та групу тварин із діабетом, які отримували розчин  $C_{60}$ -HyFn (СТЗД+ $C_{60}$ ). Щурам третьої та четвертої груп одноразово інтраперитонеально вводили 60 мг/кг СТЗ («Sigma», США), розчиненого в натрій-цитратному буфері (0.1 М, рН 4.5), що забезпечувало індукцію експериментального діабету. Тваринам контрольних груп ін'єкували розчинник у відповідному об'ємі. Щури другої та четвертої груп отримували розчин  $C_{60}$  (40 нг/мл, що відповідає концентрації  $C_{60}$  60 нМ) у питній воді протягом 12 тижнів (з моменту індукції діабету в четвертій групі до декапітації).

Щурів зважували кожного тижня від початку до закінчення досліду. Рівень глюкози у венозній крові вимірювали за допомогою глюкометра («ACCU-Check Active»; «Roche Diagnostics», ФРН) за три доби до введення СТЗ та кожного тижня після такої ін'єкції. Виразений діабет ідентифікували згідно з концентрацією глюкози в крові не менше 20 мМ. Через 12 тижнів із моменту індукції діабету в третій та четвертій групах щурів усіх груп декапітували під ефірним наркозом. Зразки крові тварин центрифугували при 3000g протягом 10 хв та відбирали сироватку. У сироватці визначали концентрацію глюкози, інсуліну (Rat Insulin Kit; «Linco Research», США), проводили імуноензимний аналіз (ELISA, Elx-800; «BioTek Instruments», США) та визначали вміст глікозильованого гемоглобіну (HbA1c; «Alfabiotech», Італія).

Сітківку обох очей відокремлювали для отримання протеїнових екстрактів та виготовлення фіксованих зразків для імуногістохімічних досліджень. Гомогенат сітківки (10 %, маса/об'єм) готували в трис-буфері (50 мМ, рН 7.6) із доданням 0.5 %-вого розчину додецилсульфату Na (DSN) у 0.15 М NaCl, 1.0 мМ EGTA, 2.5 мМ EDTA, 6.5 мкМ аprotиніну, 1.5 мкМ пепстатину А, 23 мкМ лейпептину, 1.0 мМ фенілметилсульфонілу фториду (PMSF) та 5 мкг/мл соєвого інгібітору трипсину. Гомогенати обробляли ультразвуком тричі по 30 с за допомогою соніфікатора Labsonic M («Sartorius AG», ФРН) та центрифугували при 16 000g протягом 30 хв за температури 4 °C. Вміст загального протеїну в пробах визначали за методом Бредфорд [13]. В отриманих супернатантах визначали вміст ГФКП і склад його поліпептидних фрагментів з використанням методу імуноблотингу. Зразки протеїнових екстрактів (50 мкг/трек) розділяли електрофорезом у градієнті поліакриламідного геля (ПААГ, 7–17 %) за методикою, описаною раніше [14]. Ділянки поліпептидних зон переносили за допомогою електроблоту протягом 90 хв з ПААГ на нітроцелюлозну мембрану (RPN 203D, GE Healthcare, «Amersham Bioscience», США) з діаметром пор 0.45 мкм. Після переносу мембрани піддавали блокуванню у 5 %-вому (маса/об'єм) розчині знежиреного сухого молока протягом 90 хв за температури 37 °C. Інкубація з первинними антитілами до ГФКП (sc-9065, 1:1000; «Santa Cruz», США) або до  $\beta$ -актину (ab20272, 1:5000, Abcam, Велика Британія), розведеними в сольовому фосфатному буфері (СФБ), який вміщував 0.05 % Тритону X-100, тривала 12–14 год при 4 °C. Після інкубації мембрани п'ять разів відмива-

ли від антитіл, що зв'язалися неспецифічно, у СФБ із 0.05 % Тритону X-100. Відмиті мембрани інкубували зі вторинними антитілами (SAB3700848, 1:10000; «Sigma-Aldrich», США), кон'югованими з пероксидазою хрому (60 хв при 37 °С), після цього аналогічним чином п'ятиразово відмиваючи їх у СФБ з 0.05 % Тритону X-100. Виявлення імунореактивних поліпептидних зон проводили в 50 мМ трис-НСІ-буфері (рН 7.4), який вміщував 0.01 % діамінобензидину (ДАБ) та 0.2 %  $H_2O_2$ . Числові дані нанесених проб за кількістю протеїну додатково нормували щодо інтенсивності забарвлення зон  $\beta$ -актину у відповідних зразках. Антигени з різною молекулярною масою були ідентифіковані за допомогою маркерів з відомим значенням цього показника (PageRuler Prestained Protein Ladder; «Fermentas», ФРН). Скановані результати імуноблотингу піддавали денситометричному аналізу з використанням програмного забезпечення TotalLab TL120 («Nonlinear Inc.», США).

Імуногістохімічне визначення ГФКП проводили у фіксованих зрізах сітківки. Свіжі зразки тканини фіксували у 4 %-вому розчині параформальдегіду протягом 2 год. Парафінові блоки виготовляли за загальноприйнятою методикою [15]. Після депарафінізації зрізи завтовшки 5 мкм інкубували в розчині, який вміщував 10 % метанолу й 0.5 % пероксиду водню, протягом 15–20 хв при кімнатній температурі (для блокування ендогенної пероксидазної активності). Блокування неспецифічного зв'язування антитіл проводили із використанням 3 %-вого розчину бичачого сироваткового альбуміну (БСА) у СФБ (60 хв при кімнатній температурі). Інкубацію з антитілами до ГФКП (1/200) здійснювали протягом 10 год при 4 °С. Після промивання зрізи інкубували із вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому (розведення 1/200, протягом 60 хв при 37 °С), промивали та проявляли у 0.05 %-вому розчині ДАБ+0.03 %  $H_2O_2$  у трис-буфері (0.1 М, рН 7.4). Після цього зрізи промивали водою та додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра, висувували і заводили в бальзам. Імунореактивні зони спостерігали та фотографували за допомогою мікроскопа Olympus CX41 («Olympus Еигора SE and Co.», ФРН). Усі процедури дослідження проводили в стандартизованих умовах. Електронні файли зображень формували за допомогою Adobe PhotoShop 7.0 (США). Маніпуляції з файлами зображень були обмежені лише установкою порогових значень яскравості.

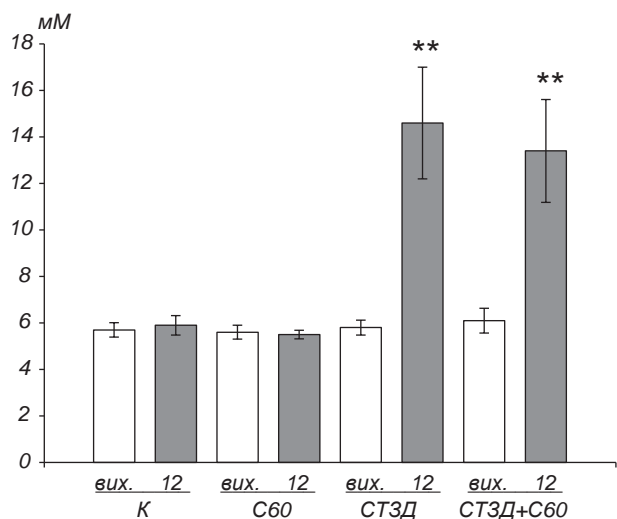
Водний розчин фулерену  $C_{60}H_{12}N_2$  («MER Corporation», США) готували зі зразків із чистотою не менш 99.5 % без використання солюбілізаторів або будь-якої хімічної модифікації. Метод переведення фулерену з органічного розчинника у водну фазу за допомогою обробки ультразвуком дозволяє отримати розчин  $C_{60}H_{12}N_2$  із концентрацією до  $5.5 \cdot 10^{-3}$  М. Залежно від концентрації  $C_{60}H_{12}N_2$  розчин вміщує як окремі молекули фулерену, так і їх лабільні нанокластери з розмірами 3–36 нм [16]. У даній роботі ми використовували вихідний розчин із концентрацією  $8.88 \cdot 10^{-4}$  М, з якого готували робочий розчин (60 нм,  $\sim 40$  нг/мл).

Статистичну обробку числових даних виконували із застосуванням стандартних методів математичної статистики для малих виборок; використовували пакети прикладних програм «Microsoft Excel 2000» (Microsoft, США) та «STATISTICA for Windows 6.0» (StatSoft Inc., США). Для нормованого вмісту ГФКП наведені середні значення  $\pm$  похибка середнього. Вірогідність міжгрупових різниць оцінювали за допомогою *t*-критерію Ст'юдента ( $P < 0.05$ ) після перевірки гіпотези про нормальність розподілень числових даних.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати визначення концентрації глюкози в сироватці крові тварин третьої та четвертої груп до введення СТЗ та через 12 тижнів після індукції СТЗД показали наявність значних відмінностей щодо відповідних величин у першій (інтактній) контрольній групі та другій групі контролю ( $C_{60}$ ); це свідчило про розвиток стійкої гіперглікемії у щурів третьої та четвертої груп (рис. 1). Якихось вірогідних різниць за вмістом глюкози в крові протягом розвитку гіперглікемії (12 тижнів) у третій та четвертій групах тварин (СТЗД та СТЗД+ $C_{60}$ ) не виявилось. Таким чином, споживання  $C_{60}H_{12}N_2$  не впливає на рівень глюкози в крові щурів з експериментальним діабетом.

Рівень же інсуліну в крові тварин третьої (СТЗД) та четвертої (СТЗД+ $C_{60}$ ) груп був помітно нижчим, ніж у контрольних групах (59 та 69 % відповідно,  $P > 0.05$ ). Різниця між цими значеннями була статистично невірогідною (що, скоріш за все, зумовлено високою варіабельністю індивідуальних значень), але вона досить чітко відображує тенденцію часткового відновлення  $\beta$ -клітин островків Лангерганса в умовах дії  $C_{60}H_{12}N_2$ . Очевидно, що це спостереження потребує подальшої експериментальної перевірки.

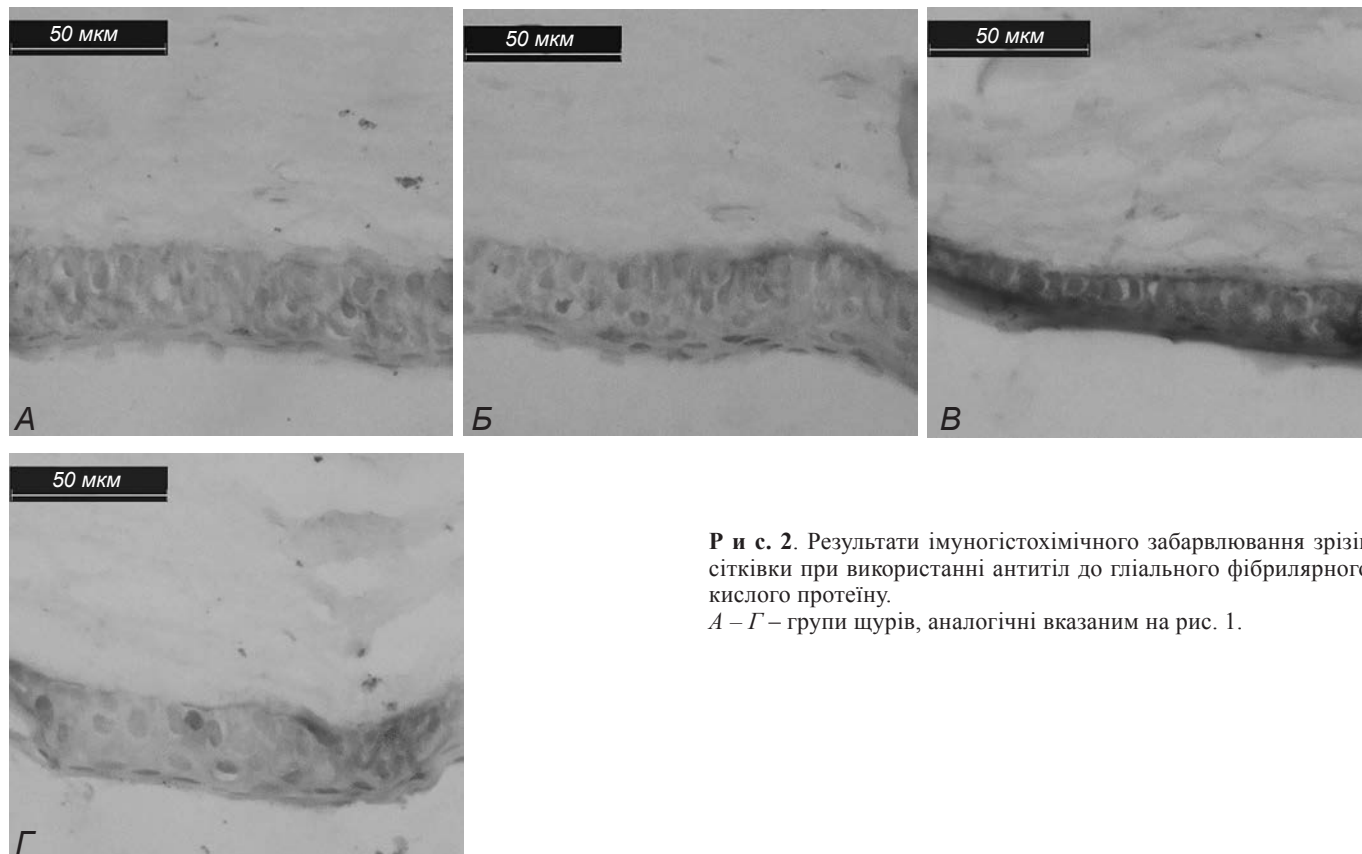


**Р и с. 1.** Концентрація глюкози у сироватці крові експериментальних щурів.

*K* – контрольна група; *C60* – група щурів, які отримували розчин  $C_{60}$  у питній воді (40 нг/мл); *СТЗД* – група щурів із стрептозототиніндукованим діабетом; *СТЗД+С60* – група щурів із СТЗД, які отримували згаданий розчин  $C_{60}$  у питній воді. Вірогідність різниць показників у відповідних групах на дванадцятий тиждень індукції СТЗД щодо вихідного значення (вих.): \*\* $P < 0.01$ .

Вміст глікозильованого гемоглобіну є визнаним показником ступеню порушення шляхів утилізації глюкози. Величина цього показника використовувалась як додатковий критерій адекватності створеної моделі СТЗД. У крові щурів СТЗД-групи середнє значення вмісту глікозильованого гемоглобіну ( $2.17 \pm 2.4$  мМ) було вірогідно вищим порівняно з таким у контрольних групах (1.0 – 1.12 мМ) ( $P < 0.05$ ). У крові ж щурів четвертої групи (СТЗД+ $C_{60}$ ) вміст глікозильованого гемоглобіну ( $1.27 \pm 0.18$  мМ) складав лише 60 % відповідного показника у групі СТЗД-тварин ( $P < 0.05$ ). Таким чином, тривале споживання  $C_{60}$ НуFn може частково, але досить істотно попереджати метаболічні порушення утилізації глюкози.

Результати імуногістохімічного забарвлення ГФКП у зрізах сітківки щурів усіх чотирьох груп свідчили про значну активацію астроцитів та клітин Мюллера у внутрішньому шарі «діабетичної» групи порівняно з відповідною картиною в першій та другій контрольних групах (рис. 2). Якихось відмінностей між інтенсивністю імунозабарвлення в зрізах сітківки тварин останніх груп (контрольної інтактної та групи щурів, які отримували  $C_{60}$ НуFn



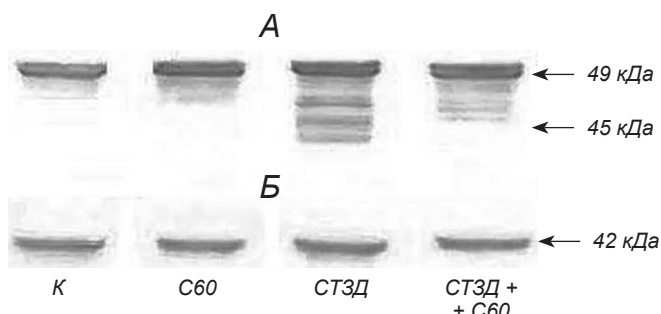
**Р и с. 2.** Результати імуногістохімічного забарвлення зрізів сітківки при використанні антитіл до гліального фібрилярного кислого протеїну.

*A – Г* – групи щурів, аналогічні вказаним на рис. 1.

у питній воді протягом 12 тижнів) не спостерігалось. Істотне зменшення рівня ГФКП-позитивного забарвлення на зрізах сітківки діабетичних щурів, що споживали  $C_{60}$ HyFn (СТЗД+ $C_{60}$ ), порівняно з цим показником у групі нелікованих тварин із діабетом (СТЗД) свідчить про значне зменшення ступеня активації ретиноглії, зумовлене споживанням гідратованого фулерену щурами з експериментальним діабетом.

У протеїнових пробах сітківки контрольних щурів, а також тварин, які отримували  $C_{60}$ HyFn із питною водою, ГФКП був представлений виключно поліпептидом із молекулярною масою 49 кДа (рис. 3). У сітківці ж щурів третьої групи (СТЗД) виявлялася присутність, окрім інтактного поліпептиду ГФКП-49 кДа, також його фрагментів із меншою молекулярною масою (в діапазоні 47–45 кДа). Вплив  $C_{60}$ HyFn значною мірою запобігав деградації ГФКП у сітківці щурів четвертої групи з діабетом. Це (разом із даними щодо зниження рівня зазначеного цитоскелетного протеїну) вказує на зниження ступеня активації ретиноглії в умовах розвитку діабету. Наявність продуктів обмеженої протеолітичної деградації ГФКП є додатковим маркером реактивного гліюзу в ЦНС та сітківці [17, 18]. При цьому слід визнати, що потенційна роль фрагментів цитоскелетних протеїнів у регуляції клітинних функцій поки що залишається невідомою. Обмежений протеоліз ГФКП може здійснюватися каспазами, які активуються в клітинах реактивної глії в умовах діабету [19].

Наявність поліпептидних фрагментів протеїну гліальних проміжних філаментів (що мають меншу молекулярну масу, ніж «інтактний» білок) у сітківці свідчить про надмірну активацію протеолітичних ензимів у даній тканині. Враховуючи той факт, що проміжні філаменти є стійкими до дії проте-



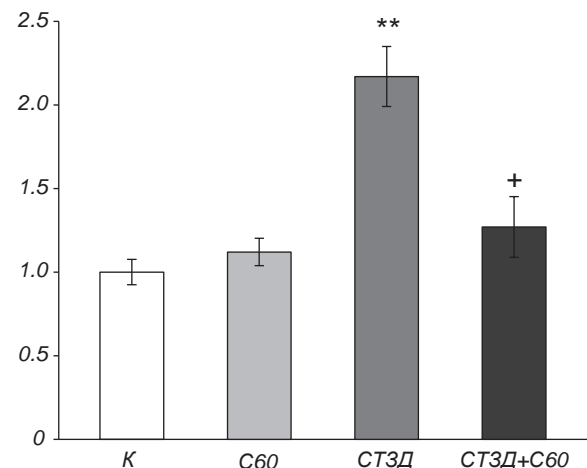
**Р и с. 3.** Результати імуноблотингу екстрактів сітківки при використанні антитіл до гліального фібрилярного кислого протеїну (А) та актину (Б).

Позначення груп тварин аналогічні таким на рис. 1.

аз, а також попередні результати щодо протеолізу ГФКП калпаїнами [6], можна вважати, що в стані гіперглікемії відбувається активна перебудова цитоскелета гліальних клітин; це є очевидним фактором, відповідальним (в усякому разі частково) за морфологічні зміни реактивних клітин.

Отримані результати вказують на те, що споживання  $C_{60}$ HyFn із питною водою протягом 12 тижнів значною мірою запобігає розвитку астрогліальної активації в сітківці, а також обмежує протеоліз проміжних філаментів у клітинах глії у щурів із СТЗ-індукованим діабетом. Особливої уваги заслуговує той факт, що споживання  $C_{60}$ HyFn здоровими щурами не викликало змін досліджуваних параметрів порівняно з тим, що спостерігалось в контрольній інтактній групі. Це є свідченням того, що застосований препарат в обраній дозі та режимі введення є нетоксичним та безпечним.

Результати визначення вмісту ГФКП із використанням денситометричного аналізу блотограм (рис. 4) узгоджуються з даними імуногістохімічних досліджень, описаними вище. Вміст ГФКП у тварин групи СТЗД був більш ніж у два рази вищим порівняно з таким у контролі ( $P < 0.01$ ). Споживання розчину  $C_{60}$ HyFn щурами з індукованим СТЗД зумовлювало значно менший вміст маркера реактивного гліюзу (58 %) порівняно з відповідним показником у групі СТЗД ( $P < 0.05$ ). При цьому відмінність рівня ГФКП у групі СТЗД+ $C_{60}$  від аналогічного показника в групі контрольних інтактних тварин була нижча рівня статистичної



**Р и с. 4.** Нормований вміст гліального фібрилярного кислого протеїну згідно з результатами денситометричного аналізу картин імуноблотингу екстрактів сітківки.

Вірогідність різниць щодо контрольної групи – \*\* $P < 0.01$ ; щодо групи із стрептозоточиніндукованим діабетом – + $P < 0.05$ . Позначення груп тварин аналогічні таким на рис. 1.

вірогідності. Споживання  $C_{60}H_{12}N_{12}$  у питній воді протягом 12 тижнів також не викликало якихось істотних змін експресії ГФКП порівняно з такою в інтактних щурів.

На сьогодні молекулярні та клітинні механізми розвитку ДР до кінця не з'ясовані, а питання щодо залучення клітин глії до патогенезу цього захворювання, що часто супроводжує діабет, залишається дискусійним. Вважається, що провідну роль у патогенезі ДР відіграють порушення активації протеїнкіназ [20], дисбаланс клітинних факторів росту [21], гемодинамічні зміни [22], розвиток окисного стресу та утворення кінцевих продуктів глікозилювання [23], розвиток запалення та поява мікроциркуляторних аномалій [24]. Відомо, що гліальні клітини є відповідальними за збереження структури і метаболічну підтримку нейронів та гангліозних клітин сітківки. В сітківці діабетичних щурів порушення метаболізму глутамату супроводжуються інтенсивною активацією як астроцитів, так і клітин мюллерівської глії, причому це відбувається вже в перші місяці розвитку діабету. Вірогідне підвищення реактивності глії у зрізах сітківки спостерігалось стабільно. Цей феномен візуалізувався як зростання імуногістохімічного забарвлення щодо ГФКП у шарі гангліозних клітин та клітин Мюллера. У таких самих зразках сітківки було показано драматичне зниження швидкості конвертації глутамату в глутамін (на 65 % порівняно з контрольним рівнем), що призводило до значного зростання концентрації даного нейротрансмітера в «діабетичній» сітківці [25]. Підвищений рівень глутамату та надмірна експресія компонентів ренін-ангіотензинової системи відіграють важливу роль у розвитку патологій сітківки, пов'язаних із діабетом [26]. Астроцити є головними клітинами, які відповідають за рециклінг глутамату – процес, що захищає нейрони від ексайтотоксичності цього трансмітера [27]. Показано, що гліколітичні процеси в гліальних клітинах тісно пов'язані з вивільненням глутамату з нейронів та його поглинанням глією [28]. Гіперглікемія викликає в астроцитах порушення гліколітичного розщеплення глюкози [29]. Через зниження активності гліцеральдегід-3-фосфатази та піруваткінази й одночасну активацію фосфофруктокінази при цьому з'являється надлишок глюкозо-6-фосфату, який утилізується через поліольний шлях [30]. Відомо, що лактат є важливим енергетичним субстратом, який постачається астроцитами до нейронів [31]. Відповідно, послаблення утворення лактату приз-

водить до того, що забезпечення нейронів АТФ стає недостатнім та розвивається енергетичний дефіцит. Слід мати на увазі, що наслідки гліальної активації в сітківці можуть бути різними залежно від тривалості та інтенсивності цього процесу. З одного боку, астрогліоз призводить до певної стимуляції нейронів через підвищення синтезу нейротрофічних факторів, тобто він виконує певну цитопротективну функцію. З іншого боку, надмірний гліоз сприяє нейродегенерації та розвитку ретинопатії [32].

Порушення гліколітичного шляху в умовах гіперглікемії зумовлює зростання синтезу *de novo* діацилгліцеролу, який є ключовим активатором протеїнкінази С [33, 34]. У свою чергу, через активацію протеїнкінази С запускаються каскадні процеси, що впливають на проникність ендотелію, експресію фактора росту ендотелію судин (VEGF) [21], ретинальну гемодинаміку [22] та активність та адгезію лейкоцитів [20].

Слід мати на увазі, що взаємозалежність сигнальних шляхів між клітинами судин, гліоцитами та нейронами є досить складною. Тому гіперглікемія може викликати істотні порушення одночасно в клітинах усіх цих типів. В умовах гіперглікемії високий рівень глюкози в тканині сітківки корелює зі зростанням вивільнення глутамату та розвитком окисного стресу [35, 36]. Аналогічним чином гіперглікемія індукує розвиток окисного стресу та астроцитозу в клітинах мозку, що є однією з поширених причин нейродегенерації та погіршення функцій ЦНС при захворюванні на діабет [37]. Інтенсифікація окисного стресу в сітківці діабетичних щурів супроводжується значним зниженням експресії транспортерів глюкози GLUT1 та GLUT3, а також критичним зростанням вмісту кінцевих продуктів переокисного окиснення ліпідів [38]. Зважаючи на вказаний комплекс причин, саме гліальні клітини можуть розглядатись як ключовий об'єкт, на котрий має бути спрямована дія нейропротекторних засобів з метою корекції ДР. Виглядає вірогідним, що виявлена в нашому дослідженні значна нормалізація вмісту ГФКП у сітківці діабетичних щурів є опосередкованою саме антиоксидантними властивостями фулерену [8]. Отримані дані щодо поліпшення стану глії в сітківці при розглянутій патології узгоджуються з результатами попередніх досліджень. В них було показано, що саме гідратована форма хімічно немодифікованого  $C_{60}$  здатна реалізувати протективні ефекти щодо глії в головному мозку ссавців у разі хронічного впливу етилового спирту [39] та

експериментального СТЗ-діабету [7]. На сьогодні вже накопичився значний об'єм свідчень стосовно нейрозахисних ефектів різних водорозчинних похідних фулерену. Зокрема, такі ефекти виявляються в умовах індукованої мітохондріальної дисфункції [40], запалення, ішемії та гіпоксії [41, 42], експериментального паркінсонізму [43] та амілоїдозу [44].

В перебігу нашого дослідження вперше було отримано експериментальні докази ефективності використання  $C_{60}$ НuFn з метою запобігання надмірного гліозу в сітківці. Виявлені ефекти гідратованого  $C_{60}$  фулерену щодо реактивності ретинолії, інтенсивності деградації ГФКП, перебудов цитоскелета та вмісту глікозильованого гемоглобіну, очевидно, вказують на те, що дія досліджуваного препарату в організмі діабетичних щурів є мультифакторіальною.

$C_{60}$ НuFn представляє собою ефективний антиоксидант, який за механізмами антирадикальної дії кардинально відрізняється від усіх інших відомих антиоксидантів. Доведено, що фулерен у гідратованому стані каталізує реакції дисмутації та знешкодження вільних радикалів завдяки унікальним властивостям водної фази, яка оточує поверхні як окремих молекул  $C_{60}$ , так і їх нанорозмірних кластерів [8, 45]. Кумулятивний розвиток окисного стресу в ендотеліальних, гліальних клітинах та нейронах сітківки призводить до дисбалансу між продукцією широкого кола регуляторів клітинної активності та прозапальних факторів. Це індукує локальні ушкодження окремих клітинних шарів сітківки та негативно відбивається на їх функціонуванні. Існують вагомі причини вважати, що зміни балансу між нейротоксичними та нейропротекторними факторами зумовлюють здатність до кращого виживання та збереження функцій ретинальних нейронів. Існують дані про зв'язок між показниками ішемічного синдрому в очах та сегментованої неоваскуляризації сітківки у пацієнтів із діабетом. Більш ніж у 50 % пацієнтів з ДР, яка супроводжується стенозом каротидних артерій і зниженням швидкості кровотоку в судинах, в сітківці діагностують розвиток неоваскуляції. Як відомо, активація гліальних клітин, що формують гемато-ретинальний бар'єр, індукує аномальний ангиогенез у сітківці [46]. Ішемічні ушкодження виступають як ініціатор проліферації ендотеліальних і гліальних клітин у сітківці при діабеті. Встановлено, що у відповідь на пошкодження активовані гліоцити індукують та підтримують у сітківці проангіогенний стан завдяки посиленому синтезу та секретії низки цитокі-

нів та мітогенів, зокрема VEGF [47, 48]. Наслідком гіперактивації ендотеліоцитів та запуску ангиогенних процесів стає утворення надмірної кількості капілярів, що характеризуються підвищеними ламкістю та проникністю. Патологічна картина, яку провають реактивні гліоцити в сітківці, супроводжується розвитком запальних процесів, набряків, крововиливів, порушенням цілісності гемато-ретинального бар'єра. Встановлено, що аномальний ангиогенез є головною причиною розвитку відшарування сітківки та, як наслідок, порушень та втрати зору у хворих на діабет [49]. Враховуючи критичні щодо забезпечення життєздатності нейронів функції гліальних клітин, саме останні, вірогідно, слід розглядати як головну мішень для терапевтичних засобів в умовах широкого кола патогенетичних порушень у нервовій системі [50]. Той факт, що реактивний гліоз у сітківці, на розвиток якого вказує посилення експресії ГФКП, досить ефективно запобігається споживанням  $C_{60}$ НuFn, свідчить про доцільність використання цього препарату з метою корекції ретинопатії при цукровому діабеті. Отримані нами дані узгоджуються з результатами інших авторів, які показали ефективність таких антиоксидантів, як ебселен [51], вітамін Е [52] і мелатонін [53], у відповідних ситуаціях. Вказані агенти відновлюють нормальне функціонування глії в умовах діабетіндукованого окисного стресу в сітківці. Нещодавно був встановлений протективний ефект гістидинату хрому (CrHis) у сітківці щурів із СТЗ-діабетом, який визначали згідно з оцінкою гістопатологічних показників морфології ретинальних клітинних шарів. Були виявлені виражені антидіабетичні ефекти щоденного споживання CrHis у дозі 110 мкг/кг щодо показників окисного стресу, експресії транспортерів глюкози (GLUT1 і GLUT3), вмісту глікозильованого гемоглобіну та загального холестеролу [38]. Слід, проте, при цьому зауважити, що гідратований фулерен, на відміну від більшості з відомих антиоксидантів, є нетоксичною та біосумісною речовиною з високою біологічною активністю навіть за наднизьких доз [8, 54]. Ці обставини відкривають широкі перспективи для використання  $C_{60}$ НuFn як безпечного й ефективного агента для профілактики та терапії таких ускладнень діабету, як ретинопатії.

Одним із важливих ефектів гіперглікемії, що призводить до нейродегенерації, є неензиматичне глікозильовання. Хронічна гіперглікемія створює умови для реакцій неензиматичної конденсації між відновленою глюкозою та амініними залиш-



ками протейнів, нуклеїновими основами, а також ліпідами. Це призводить до незворотного формування комплексів, що отримали назву кінцевих продуктів глікозилювання. Такі речовини активують фактор NF-κB та NADPH-оксидазу, що додатково сприяє генерації реактивних форм кисню та розвитку апоптозу в ретинальних нейронах. Продукти глікозилювання акумулюються в періцитах, викликають ушкодження ендотеліальних клітин та впливають на функції гемато-ретинального бар'єра [55]. Виявлені в нашому дослідженні відмінності вмісту глікозилюваного гемоглобіну в експериментальних групах вказують на істотну активацію глікозилювання у тварин із діабетом. Споживання розчину C<sub>60</sub> щурами групи СТЗД+C<sub>60</sub> протягом 12 тижнів сприяло вираженому зниженню рівня глікозилюваного гемоглобіну в сироватці тварин із СТЗ-індукованим діабетом (див. таблицю). Такий результат може бути зумовлений певною нормалізацією окисно-відновлювального балансу в тканинах щурів в умовах гіперглікемії під впливом наночасток фулерену [8].

Отже, на підставі отриманих даних можна дійти висновку, що хімічно немодифікований гідратований фулерен (C<sub>60</sub>HуFn) ефективно попереджує негативні зміни в гліальному цитоскелеті та надмірну активацію ретиноглії у щурів при діабеті. C<sub>60</sub>HуFn може бути використаний як молекулярний інструмент для подальшого дослідження механізмів реципрокної регуляції відносин між ендотеліальними клітинами, клітинами макроглії та гангліозними клітинами сітківки в умовах гіперглікемії.

Автори вдячні канд. хім. наук Г. В. Андрієвському за люб'язне надання препарату гідратованої форми фулерену C<sub>60</sub> для проведення досліджень.

Усі стадії дослідження відповідали положенням Європейської Конвенції щодо захисту тварин, які використовуються в експериментах (86/609 ЄС, 1986, Страсбург), і нормативам національних і місцевих Комітетів із біоетики.

Автори даної роботи – В. С. Недзвецький, І. В. Прищепка, А. О. Тихомиров та Г. Байдаш – підтверджують відсутність будь-яких конфліктів щодо комерційних або фінансових відносин, відносин з організаціями або особами, котрі будь-яким чином могли бути пов'язані з дослідженням, а також взаємовідносин співавторів статті.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. E. Rungger-Brändle, A. A. Dosso, and P. M. Leuenberger, "Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, No. 7, 1971-1980 (2000).
2. A. Ebnetter and M. S. Zinkernagel, "Novelties in diabetic retinopathy," *Endocrinol. Dev.*, **31**, 84-96 (2016).
3. R. Klein, B. E. K. Klein, and S. E. Moss, "Epidemiology of proliferative diabetic retinopathy," *Diabetes Care*, **15**, No. 12, 1875-1891 (1992).
4. B. Liu, X. Ma, D. Guo, et al., "Neuroprotective effect of alpha-lipoic acid on hydrostatic pressure-induced damage of retinal ganglion cells *in vitro*," *Neurosci. Lett.*, **526**, No. 1, 24-28 (2012).
5. В. С. Недзвецький, Г. А. Ушакова, С. Г. Бусыгина и др., "Влияние малых доз ионизирующей радиации на промежуточные филаменты и Ca-активируемую систему протеолиза головного мозга крысы", *Радиобиология*, **31**, № 3, 333-339 (1991).
6. R. Dringen, P. G. Pawlowski, and J. Hirrlinger, "Peroxide detoxification by brain cells," *J. Neurosci. Res.*, **79**, Nos. 1/2, 157-165 (2005).
7. V. Nedzvetsky, G. Andrievsky, T. Chachibaia, and A. Tykhomyrov, "Differences in antioxidant/protective efficacy of hydrated C<sub>60</sub> fullerene nanostructures in liver and brain of rats with streptozotocin-induced diabetes," *J. Diabetes Metabolism*, **3**, No. 8, 1-9 (2012).
8. G. Andrievsky, V. I. Bruskov, A. A. Tykhomyrov, and S. V. Gudkov, "Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C<sub>60</sub> fullerene nanostructures *in vitro* and *in vivo*," *Free Radical Biol. Med.*, **47**, No. 6, 786-793 (2009).
9. J. Ryan, H. R. Bateman, A. Stover, et al., "Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response," *J. Immunol.*, **179**, No. 1, 665-672 (2007).
10. E. O. Etem, R. Bal, A. E. Akağaç, et al., "The effects of hydrated C(60) fullerene on gene expression profile of TRPM2 and TRPM7 in hyperhomocysteinemic mice," *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, **34**, No. 4, 317-324 (2014).
11. T. Mori, S. Ito, M. Namiki, et al., "Involvement of free radicals followed by the activation of phospholipase A2 in the mechanism that underlies the combined effects of methamphetamine and morphine on subacute toxicity or lethality in mice: Comparison of the therapeutic potential of fullerene, mepacrine, and cooling," *Toxicology*, **236**, No. 3, 149-157 (2007).
12. T. Baati, F. Bourasset, N. Gharbi, et al., "The prolongation of the lifespan of rats by repeated oral administration of [60] fullerene," *Biomaterials*, **33**, No. 19, 4936-4946 (2012).
13. M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
14. U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature*, **227**, No. 5259, 680-685 (1970).
15. K. Canene-Adams, "Preparation of formalin-fixed paraffin-embedded tissue for immunohistochemistry," *Meth. Enzymol.*, **533**, 225-233 (2013).

16. G. V. Andrievsky, V. K. Klochkov, E. L. Karyakina, and N. O. Mchedlov-Petrosyan, "Studies of aqueous colloidal solutions of fullerene C<sub>60</sub> by electron microscopy," *Chem. Phys. Lett.*, **300**, Nos. 3/4, 392-396 (1999).
17. A. Tura, F. Schuettauf, P. P. Monnier, et al., "Efficacy of Rho-kinase inhibition in promoting cell survival and reducing reactive gliosis in the rodent retina," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **50**, No. 1, 452-461 (2009).
18. M. Sugaya-Fukasawa, T. Watanabe, M. Tamura, et al., "Glial fibrillary acidic protein is one of the key factors underlying neuron-like elongation in PC12 cells," *Exp. Ther. Med.*, **2**, No. 1, 85-87 (2011).
19. A. M. Joussen, S. Doehmen, M. L. Le, et al., "TNF- $\alpha$  mediated apoptosis plays an important role in the development of early diabetic retinopathy and long-term histopathological alterations," *Mol. Vis.*, **15**, 1418-1428 (2009).
20. L. P. Aiello, A. Clermont, V. Arora, et al., "Inhibition of PKC by oral administration of ruboxistaurin is well tolerated and ameliorates diabetes-induced retinal hemodynamic abnormalities in patients," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **47**, No. 1, 86-92 (2006).
21. V. Haurigot, P. Villacampa, A. Ribera, et al., "Increased intraocular insulin-like growth factor-I triggers blood-retinal barrier breakdown," *J. Biol. Chem.*, **284**, No. 34, 22961-22969 (2009).
22. A. Hennis, S. Y. Wu, B. Nemesure, et al., "Hypertension, diabetes, and longitudinal changes in intraocular pressure," *Ophthalmology*, **110**, No. 5, 908-914 (2003).
23. H. Zong, M. Ward, and A. W. Stitt, "AGEs, RAGE, and diabetic retinopathy," *Current Diabet. Rep.*, **11**, No. 4, 244-252 (2011).
24. B. E. K. Klein, M. D. Knudtson, M. Y. Tsai, and R. Klein, "The relation of markers of inflammation and endothelial dysfunction to the prevalence and progression of diabetic retinopathy: Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy," *Arch. Ophthalmol.*, **127**, No. 9, 1175-1182 (2009).
25. E. Lieth, A. J. Barber, B. Xu, et al., "Glial reactivity and impaired glutamate metabolism in short-term experimental diabetic retinopathy," *Diabetes*, **47**, No. 5, 815-820 (1998).
26. J. L. Wilkinson-Berka, "Angiotensin and diabetic retinopathy," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **38**, Nos. 5/6, 752-765 (2006).
27. W.-K. Ju, K.-Y. Kim, Y. H. Noh, et al., "Increased mitochondrial fission and volume density by blocking glutamate excitotoxicity protect glaucomatous optic nerve head astrocytes," *Glia*, **63**, No. 5, 736-753 (2015).
28. P. Mamczur, B. Borsuk, J. Paszko, et al., "Astrocyte-neuron crosstalk regulates the expression and subcellular localization of carbohydrate metabolism enzymes," *Glia*, **63**, No. 2, 328-340 (2015).
29. B. S. Ganesh and S. K. Chintala, "Inhibition of reactive gliosis attenuates excitotoxicity-mediated death of retinal ganglion cells," *PLoS One*, **6**, No. 3, e18305 (2011).
30. K. R. Hegde, S. Kovtun, and S. D. Varma, "Inhibition of glycolysis in the retina by oxidative stress: prevention by pyruvate," *Mol. Cell Biochem.*, **343**, Nos. 1/2, 101-105 (2010).
31. L. Pellerin and P. J. Magistretti, "Sweet sixteen for ANLS," *J. Cerebr. Blood Flow Metab.*, **32**, No. 7, 1152-1166 (2012).
32. M. V. Sofroniew, "Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation," *Trends Neurosci.*, **32**, No. 12, 638-647 (2009).
33. Q. J. Wang, "PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling," *Trends Pharmacol. Sci.*, **27**, No. 6, 317-323 (2006).
34. D. Koya and G. L. King, "Protein kinase C activation and the development of diabetic complications," *Diabetes*, **47**, No. 6, 859-866 (1998).
35. L. P. Aiello, S. E. Bursell, A. Clermont, et al., "Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C *in vivo* and suppressed by an orally ejective  $\beta$ -isoform-selective inhibitor," *Diabetes*, **46**, No. 9, 1473-1480 (1997).
36. Q. Li and D. G. Puro, "Diabetes-induced dysfunction of the glutamate transporter in retinal Muller cells," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **43**, No. 9, 3109-3116 (2002).
37. G. Baydas, V. S. Nedzvetskii, S. V. Kirichenko, and P. A. Nerush, "Astrogliosis in the hippocampus and cortex and cognitive deficits in rats with streptozotocin-induced diabetes: effects of melatonin," *Neurophysiology*, **40**, No. 2, 91-97 (2008).
38. M. Ulas, C. Orhan, M. Tuzcu, et al., "Anti-diabetic potential of chromium histidinate in diabetic retinopathy rats," *BMC Complement. Alternat. Med.*, **15/16**, 1-8 (2015).
39. A. A. Tykhomyrov, V. S. Nedzvetsky, V. K. Klochkov, and G. V. Andrievsky, "Nanostructures of hydrated C<sub>60</sub> fullerene (C<sub>60</sub>HyFn) protect rat brain against alcohol impact and attenuate behavioral impairments of alcoholized animals," *Toxicology*, **246**, Nos. 2/3, 158-165 (2008).
40. S. Ye, T. Zhou, K. Cheng, et al., "Carboxylic acid fullerene (C<sub>60</sub>) derivatives attenuated neuroinflammatory responses by modulating mitochondrial dynamics," *Nanoscale Res. Lett.*, **10**, No. 1, 953 (2015).
41. F. Fluri, D. Grünstein, E. Cam, et al., "Fullerenols and glucosamine fullerenes reduce infarct volume and cerebral inflammation after ischemic stroke in normotensive and hypertensive rats," *Exp. Neurol.*, **265**, 142-151 (2015).
42. D. Giust, T. Da Ros, M. Martín, and J. L. Albasanz, "[60] Fullerene derivative modulates adenosine and metabotropic glutamate receptors gene expression: a possible protective effect against hypoxia," *J. Nanobiotechnol.*, **12**, 27 (2014).
43. L. L. Dugan, L. Tian, K. L. Quick, et al., "Carboxyfullerene neuroprotection postinjury in Parkinsonian nonhuman primates," *Ann. Neurol.*, **76**, No. 3, 393-402 (2014).
44. E. G. Makarova, R. Y. Gordon, and I. Y. Podolski, "Fullerene C<sub>60</sub> prevents neurotoxicity induced by intrahippocampal microinjection of amyloid-beta peptide," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **12**, No. 1, 119-126 (2012).
45. A. G. Bobylev, N. V. Pen'kov, P. A. Troshin, and S. V. Gudkov, "Effect of dilution on aggregation of nanoparticles of polycarboxylic derivative of fullerene C<sub>60</sub>," *Biofizika*, **60**, No. 1, 38-43 (2015).
46. Y. Cheng, J. Qu, Y. Chen, et al., "Anterior segment neovascularization in diabetic retinopathy: a masquerade," *PLoS One*, **10**, No. 6, e0123627 (2015).
47. I. Suárez, G. Bodega, M. Rubio, et al., "Astroglial induction of *in vivo* angiogenesis," *J. Neural. Transplant. Plast.*, **5**, No. 1, 1-10 (1994).
48. N. J. Coorey, W. Shen, S. H. Chung, et al., "The role of glia in retinal vascular disease," *Clin. Exp. Optom.*, **95**, No. 3, 266-281 (2012).
49. D. A. Antonetti, R. Klein, and T. W. Gardner, "Diabetic retinopathy," *New Engl. J. Med.*, **366**, No. 13, 1227-1239 (2012).

50. B. A. Barres, "The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease," *Neuron*, **60**, No. 3, 430-440 (2008).
51. S. M. Tan, D. Deliyanti, W. A. Figgett, et al., "Ebselen by modulating oxidative stress improves hypoxia-induced macroglial Müller cell and vascular injury in the retina," *Exp. Eye Res.*, **136**, 1-8 (2015).
52. R. Pazdro and J. R. Burgess, "The role of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications," *Mech. Ageing Dev.*, **131**, No. 4, 276-286 (2010).
53. T. Jiang, Q. Chang, Z. Zhao, et al., "Melatonin-mediated cytoprotection against hyperglycemic injury in Müller cells," *PLoS One*, **7**, No. 12, e50661 (2012).
54. N. Gharbi, M. Pressac, M. Hadchouel, et al., "[60]Fullerene is a powerful antioxidant *in vivo* with no acute or subacute toxicity," *Nano Lett.*, **5**, No. 12, 2578-2585 (2005).
55. S. Yamagishi, S. Maeda, T. Matsui, et al., "Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes," *Biochim. Biophys. Acta*, **1820**, No. 5, 663-671 (2012).