

Diabéteszes retinopathia valamint a vese érpermeabilitás-változásának vizsgálata kísérleti állatokon, fluoreszceinnel jelölt albumin segítségével

Dóczi-Keresztesi Zoltán^{1,2}, Jung János³, Ember István⁴, Kiss István⁴, Mezei Tibor³

1. Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Gyógyszertan Tanszék, 2. Szemészeti Klinika, 3. Patológia Tanszék, 4. Népegészségtani Intézet, Pécsi Tudományegyetem, Orvostudományi Kar

Evaluarea modificărilor de permeabilitate vasculară la nivel retinian și renal în diabetul zaharat experimental folosind albumină marcată cu fluoresceină

În studiul de față, am urmărit extravazarea albuminei la nivel retinian și renal, comparând grupe de animale cu diabet zaharat și non-diabetice (control). Diabetul zaharat a fost indus experimental cu o singură injecție intraperitoneală de Alloxan, la șobolani tip Wistar. S-au prelevat probe de sânge din vena cozii animalelor, s-a determinat glicemia și la valori peste 13.7 mmol/l, animalul a fost considerat diabetic. După 6 săptămâni de la inducerea diabetului, s-a injectat în vena cozii animalelor albumină serică bovină marcată cu fluoresceină (FITC-BSA), urmat de prelucrarea specială histopatologică a țesutului retinian și renal. Țesuturile au fost examinate cu ajutorul unui microscop cu fluorescență. Extravazarea FITC-BSA a fost măsurată folosind un program pentru procesarea imaginilor la nivel retinian și renal. Fluorescența țesuturilor a fost comparată cu fluorescența serului, măsurată cu ajutorul unui spectofotometru. S-a comparat, de asemenea, fluorescența retinei și a țesutului renal. Valorile obținute s-au prelucrat statistic. Rezultate: Am comparat pentru prima oară modificările de permeabilitate vasculară la nivel retinian și renal în diabetul zaharat experimental. S-a constatat diferență semnificativă statistic între grupul de control și cel diabetic. S-a constatat de asemenea corelație pozitivă, comparând fluorescența retinei și a țesutului renal. Fluorescența a putut fi măsurată separat pentru diferitele straturi ale retinei, în timp ce media s-a corelat cu fluorescența serului. Metoda ar putea fi folosită pentru testarea impactului unor medicamente asupra modificărilor de permeabilitate vasculară la nivel retinian și renal.

Cuvinte-cheie: diabet experimental, permeabilitate vasculară, FITC-BSA, Alloxan, retinopatie diabetică

Assessment of retinopathy and renal vascular permeability changes in diabetic rats, using fluorescein-labeled albumin

In the present study, we compared the extravasation of albumin in retinal and renal tissues, between diabetic and non-diabetic (control) animals. Male Whistar rats were made diabetic by single intraperitoneal injection of Alloxan, and another control group received vehicle. 6 weeks after Alloxan treatment, permeability of blood-retinal barrier and renal vessels were measured by the extravasation of fluorescein isothiocyanate labeled bovine serum albumin (FITC-BSA) using a fluorescence microscope. Fluorescence was assayed with an image processing program, comparing the retina and renal tissues. Tissue fluorescence was compared with serum fluorescence, measured with a spectofotometer. Results: We compared for the first time retinal and renal vascular permeability changes in diabetic animals. The difference between the control and diabetic group was statistically significant. A positive correlation could be observed between the retina and kidney tissue fluorescence. The fluorescence of different retinal layers could be measured separately, while the average was in concordance with serum fluorescence. The presented method can be used for testing different drugs, in their impact to the permeability changes of retinal and renal vessels in diabetes.

Keywords: diabetic retinopathy, experimental diabetes, Alloxan, FITC-BSA, vascular permeability

Orvostudományi Értesítő, 2012, 85 (1): 25-30

www.orvtudert.ro

A cukorbetegség (DM) napjainkban a jelentős járványügyi probléma, ugyanis egyre nagyobb az előfordulása: kb 7.000.000 új beteget jegyeznek be évente világviszonylatban [10]. 2009-ben 246 millió, főként 2-es típusú diabéteszes beteget tartottak nyilván világszerte. 2025-re a cukorbetegség száma várhatóan 380 millióra nő majd, ami 7,1%-át teszi ki a bolygó felnőtt lakosságának.

Romániában a vakság egyik leggyakoribb oka a diabéteszes retinopathia (DR). Marosvásárhelyen a cukorbetegség gyakorisága a lakosság körében 5,8% és ezek között a diabéteszes retinopathia előfordulása 39,2% [4].

A retinopathiák előfordulásának és súlyosbodásának leggyakoribb oka a cukorbetegség, amely súlyos látásza-

varhoz, esetleg vaksághoz vezethet [13]. Számos tanulmány utal arra, hogy a cukorbetegség 15 éves fennállása után, a betegek mintegy 2%-a megvakul, míg 10%-a súlyos látáskárosodásban szenved.

A cukorbetegség 20-30%-ánál alakul ki nephropathia. A vesekárosodás különböző súlyosságú lehet, néha akár veseátültetést téve szükségessé. A veseelégtelenség a cukorbetegség több mint 20%-ánál halálhoz vezet [4, 16].

Ezért szükségesnek tartjuk, új terápiás módszerek kutatását, valamint új gyógyszerek bevezetését, amelyek megakadályozzák vagy csökkentik a diabéteszes retinopathia vascularis elváltozásai által okozott szövődményeket.

A diabéteszes retinopathia jelenlegi kezelési lehetőségei közül megemlíthető a vitreo-retinális sebészet, a szemfenéki lézerkezelés, vagy ezek kombinációja, de mindezen módszerek a már fennálló szövődmények kezelését célozzák, mint pl. az érproliferáció, valamint

Dóczi-Keresztesi Zoltán

540102 Marosvásárhely - Târgu Mureș

Cornișă 10/5

E-mail: zotyeksz@yahoo.com

a fibro-membranózus szövetburjánzás. Jogosan merül fel tehát az igény hatékonyabb megelőzést célzó, illetve kevésbé költséges kezelési módszerek iránt.

Farmakológiai megközelítésben jelenleg két terápiás stratégiát ismerünk a proliferatív diabéteszes retinopathia (PDR) kezelésében, amelyek gátolni képesek az angiogenezist a retina szintjén: különböző anyagok szisztémás alkalmazása (protein kináz C-gátlók és szomatosztatin analógok), vagy helyi kezelés [anti-VEGF (vascular endothelial growth factor), gyulladáscsökkentő anyagok, géntechnológia és őssejtterápia] [9]. Mindezen módszerek még kísérleti stádiumban vannak.

A vér-retina gát (BRB - blood-retinal barrier) funkcionális károsodása a legjellemzőbb változás diabéteszes retinopathiában. Felelős a macula ödéma kialakulásáért, amely a cukorbetegség látásélesség romlásának a leggyakoribb oka [15].

A BRB két különböző szinten található: a retina pigment-epithelium rétege mint külső barrier, és a retina ereinek endothel rétege mint belső barrier. Mindkét barrier szoros, „nem-áteresztő” intercelluláris jonctiókból áll, ahol hiányoznak a fenestratiók. Ezzel ellentétben a pajzsmirigy- és veseerek szintjén nagyon vékony az endothel sejtréteg, számos folytonossági hiány van jelen a citoplazmában és a bazális membrán is nagyon vékony és szabálytalan. Szerkezetileg a retina hajszálerei nagyon hasonlítanak az agy hajszálereihez. Kimutatták, hogy a felnőtt egyén retina erei a szén-részecskék számára átjárhatatlanok, akárcsak az agy és az iris erei. Ezzel ellentétben a vese és a pajzsmirigy erei átjárhatók voltak ugyanazon szén-részecskék számára [6, 20].

A BRB károsodását kísérletileg is igazolták, fluoreszcein-angiográfiával és üvegtesti fluorophotometriával cukorbetegeken [5, 8] valamint diabéteszes patkányokon [11]. Vinorez és mts. [22, 23] beszámolt arról, hogy a fluoreszceinnel jelölt albumin hasznos volt a BRB károsodásának kimutatásában diabéteszes betegeknek. Az albumin ugyanis egyike a szérumszűrőnek, ezért az extravaszkuláris lokalizációja a BRB károsodását jelenti [2, 18].

Streptozotocinnal (STZ) kiváltott diabéteszes patkányokon végzett kísérletek bizonyították, hogy a kezdeti BRB károsodás összefügg az endothelialis valamint a neuronális eredetű nitrogén monoxid synthase (eNOS és nNOS) expressziójának és a VEGF expressziójának növekedésével. Egyébként a BRB károsodás és a VEGF expresszió növekedésének pontos mechanizmusa diabéteszben még nem ismert [1, 2, 21]. Számos kísérlet igazolta, hogy akárcsak az STZ, az Alloxan is képes diabéteszt kiváltani, hasonló módon, a pancreas béta sejteinek pusztításával, amely I típusú diabéteszhez hasonló állapotot vált ki [7].

Több, egymással összefüggő biokémiai mechanizmus szerepét feltételezik a cukorbetegség és a hiperglikémia okozta káros hatások létrejöttében az erek szintjén, így a fokozott glukóz metabolizációt poliol reakcióúton keresztül, a késői glikációs termékek (advanced glycation end products, AGE) fokozott termelődését, a protein kináz C fokozott termelődését és a reaktív oxigén gyökök (ROS) fokozott termelődését, beleértve a nitrogén-monoxidot (NO), szuperoxidot (O_2^-) valamint a terméküket, a peroxinitritet (ONOO $_2$). A poliol reakcióúton keresztül a glukóz szorbitollá, majd fruktózzá alakul, amely NAD $^{+}$ - és NADPH felhasználásával jár. Mindez csökkenti a glutathion (GSH) regenerációját, ami megnöveli a sejtek érzékenységét az oxidatív stresszre. Ugyanezen mechanizmusok megnövekedett ozmotikus stresszt is okozhatnak, amely károsíthatja az érendothelt [14, 12].

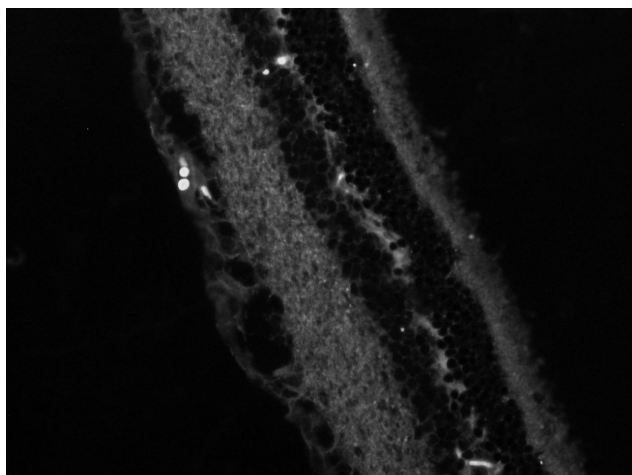
A ROS és a lipid-peroxidok fokozott termelődése már a diabéteszes retinopathia korai stádiumában kialakul. Endothel sejtek in vitro vizsgálatával kimutatták, hogy a magas glukózszt fokozza az eNOS expresszióját. Ezen kívül a peroxinitrit hozzájárulhat a vaszkuláris lézió létrejöttéhez azáltal, hogy elindítja a lipid peroxidációt és a tirozin maradványok nitrációját, valamint inaktíválja a legfontosabb metabolikus enzimeket, és csökkenti a sejtek oxidatív stressz elleni védekezőképességét [19].

Anyag és módszer

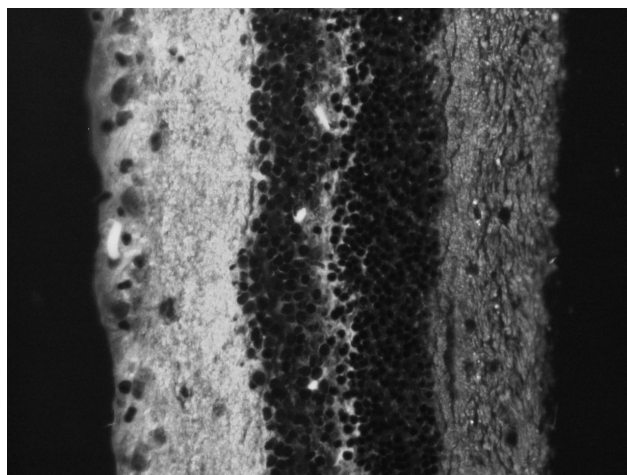
Hím Wistar patkányokat (250-300 g) használtunk kísérleteinkhez. Két hasonló testsúly és vércukor eloszlású csoportba soroltuk az állatokat: az első kontroll csoport (4 állat), nem diabéteszes, a második a diabéteszes csoport (4 állat).

A diabéteszt egyetlen intraperitoneális Alloxan injekcióval váltottuk ki, 125 mg/tskg adagban. Az Alloxan egy hasnyálmirigy béta-sejt specifikus toxin, amely elpusztítja ezeket a sejteket. (Alloxan monohidrat, Alfa Aesar GmbH & Co. KG) [7]. 24 óra múlva, ha a vércukorszint meghaladta a 13,7 mmol/l értéket, az állatot diabéteszesnek nyilvánítottuk. A vércukorszint mérése hetente történt, az állatok farokvénájából vett vérből egy automata glukométer segítségével: Accu-Chek® - Roche, Darmstadt, Germany. Az állatok testsúlyát a kísérlet elején és végén mértük.

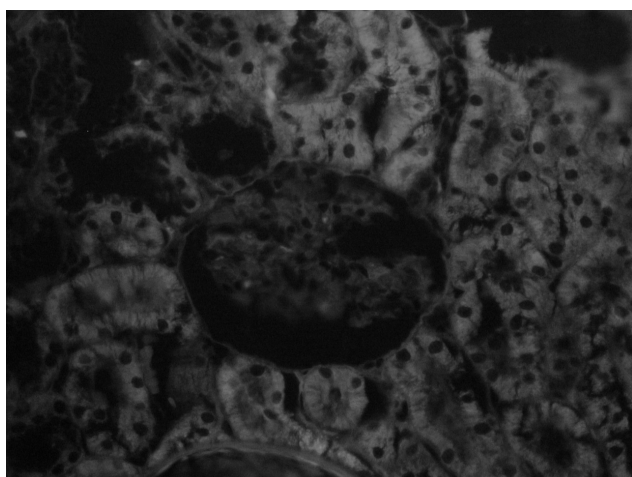
A diabétesz 6 hetes fennállását követően megvizsgáltuk a vér-retina gát permeabilitását, valamint a veseszövet érpermeabilitását az Antonetti és munkatársai [3] által leírt, részben módosított módszer segítségével, elsőként összehasonlítva a retina ereinek, valamint a vese ereinek permeabilitását.



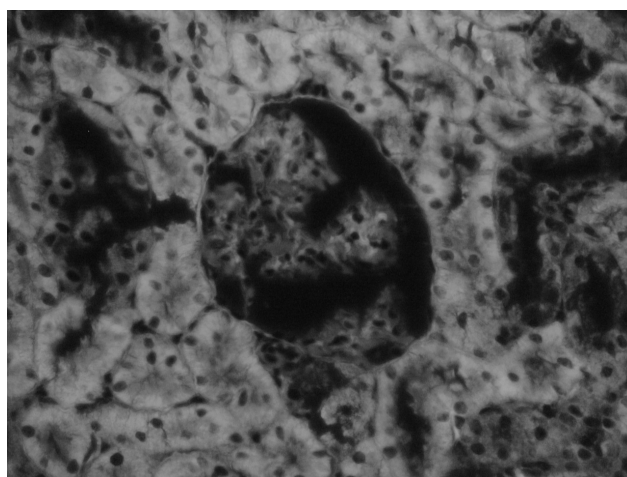
1. ábra. Nem diabéteszes retina fluoreszcenciája



2. ábra. Diabéteszes retina fluoreszcenciája



3. ábra. Nem diabéteszes vese szövet fluoreszcenciája



4. ábra. Diabéteszes vese szövet fluoreszcenciája

Pentobarbitallal végzett általános érzéstelenítés után, az állatok farokvénájába 100 mg/kg fluorescein izothiociannal jelölt bovine szerumalbumint fecskendeztünk (FITC-BSA - Sigma-Aldrich). 10 perc múlva az állatokat lefejeztük, a szemgolyókat enukleáltuk ($n = 2 \times 10$), illetve a veséket eltávolítottuk. A halál pillanatában 3 ml vért vettünk EDTA- tartalmú kémcsövekbe. A szöveteket 4%-os pufferolt formalin oldatba helyeztük ($\text{pH} = 7$) további szövettani feldolgozás céljából.

A vért 2000G-n centrifugáltuk 10 percig, majd a felülúszó plazma fluoreszcenciáját egy Shimadzu UV-160 ° típusú spektrofotométer segítségével vizsgáltuk, 433 ± 2 nm-es excitációs, valamint 455 ± 2 nm-es emissziós hullámhosszokon.

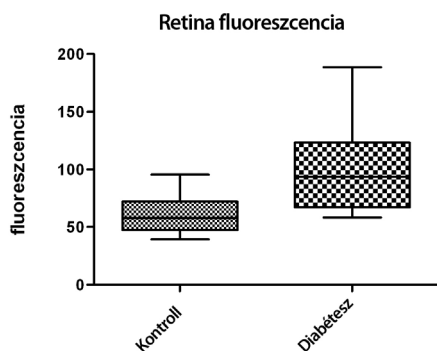
A szövetmintákat a következő módon dolgoztuk fel: a szemgolyót vízszintes síkban metsztük a látóideg szintjén, majd agar-rögzítés után paraffinba ágyaztuk. Ezután 6, egyenként 4 mikron vastag metszetet készítettünk, 80 mikron intervallumonként, majd hematoxilin-eozin festést végeztünk. Hasonlóképpen a vesénél a hílus szintjén

metsztük, majd 4 metszetet készítettünk a fent leírt jellemzők szigorú betartásával.

A metszeteket fluoreszcens mikroszkóppal felszerelt kamerával (Nikon Eclipse E800, DN100 Network Camera) vizsgáltuk és rögzítettük. A képrögzítés során általunk standardizált paramétereket használtunk: fényerősség: 4, 20x nagyítás, $\frac{1}{4}$ sec., digital gain: 100, analog gain: 280, Tonus: 1.

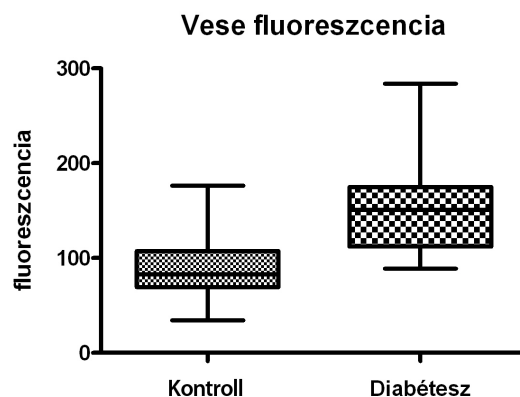
A retina-, valamint a vese szövet fluoreszcencia-intenzitását Image J program segítségével mértük, külön lebontva a zöld árnyalatra, a rögzített képek alapján, az alábbi standardok betartásával: minden metszeten 10 pontban végeztük a mérést, egyenként $200 \mu\text{m}^2$ felületen, vagyis 2 avascularis pontban, a retina 5 különböző rétegén (külső magvas, külső szemcsés, belső a magvas, a belső szemcsés, valamint a ganglionsejtréteg). A vese fluoreszcenciát mértük úgy a glomerulusok, mint a tubulusok szintjén, ugyancsak 10 különböző pontban, a fenti standardok alapján.

A szövet fluoreszcenciát a szérum fluoreszcencia függ-

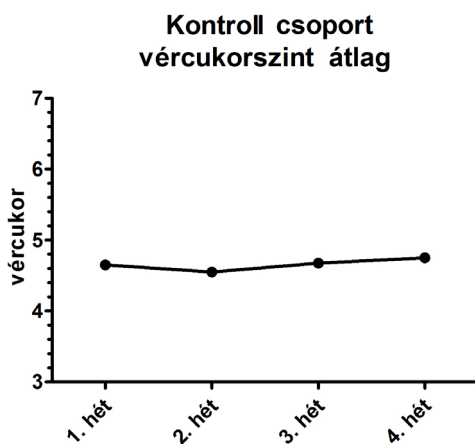


Tukey's multiple comparison test: $p < 0.05$ ($q = 8.501$), $n = 24$

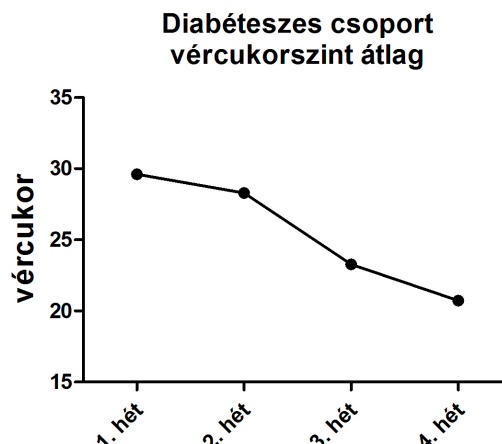
5. ábra. Retina fluoreszcencia összehasonlítása a kontroll és a diabéteszes csoport között



6. ábra. Vese fluoreszcencia összehasonlítása a kontroll és a diabéteszes csoport között



7. ábra. Kontroll csoport vércukorszint változása



8. ábra. Diabéteszes csoport vércukorszint változása

vényében számoltuk, a következő képlet segítségével:

$$\frac{(Tf1 + Tf2 + \dots + Tf10)}{Pf \times 10}$$

ahol Tf a szöveti, Pf a plazma fluoreszcenciát jelöli.

A statisztikai számításokat GraphPad Prism programmal, one way Anova és Tukey's multiple comparison tesztek segítségével végeztük.

Eredmények

A retina egyes rétegeinek fluoreszcenciája külön megfigyelhető az **1. és 2. ábrákon**. Fokozott fluorescein kiáramlás figyelhető meg a fotoreceptorok-, a külső szemcsés-, a belső szemcsés-, valamint a glomerulusok rétegében. A felvételek az anyag és módszer fejezetben leírtak alapján standardizált módon történtek.

A vese glomerulusok, illetve tubulusok szintjén látható a fluorescein kiáramlás a nem diabéteszes (**3. ábra**), valamint a diabéteszes (**4. ábra**) szövetminták esetében. Látható a foko-

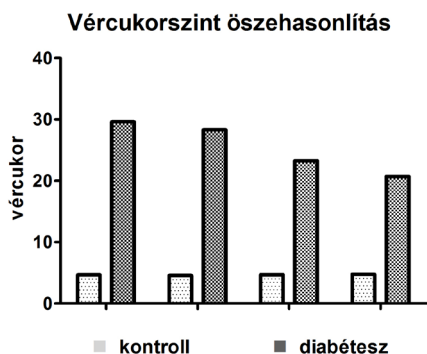
zott fluorescein kiáramlás a glomerulusok szintjén.

A szöveti fluoreszcencia értékeket, a retina valamint a vese szintjén az **1. táblázat** szemlélteti. Az értékek a különböző metszetek szintjén, 10 különböző pontban Image J segítségével mért fluoreszcencia intenzitás átlaga, a szérumszint fluoreszcencia függvényében, az anyag és módszer fejezetben leírt képlet alapján.

A mért fluoreszcencia, összehasonlítva a szérumszint fluoreszcenciával különböző volt a nem diabéteszes, valamint a diabéteszes állatok retinájának szintjén (**5. ábra**) és a vesetubulusok valamint glomerulusok szintjén (**6. ábra**) – One Way Anova, illetve Tukey tesztek felhasználásával.

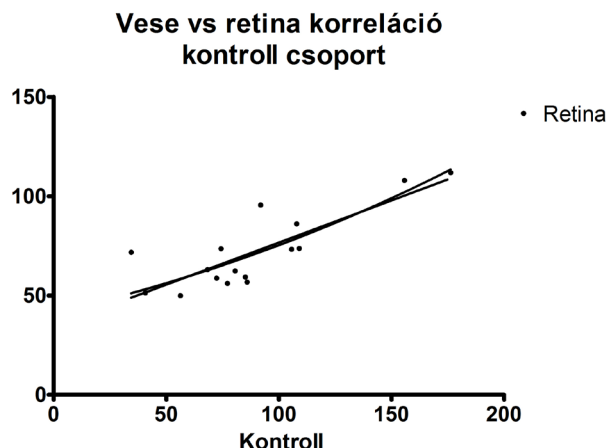
A kísérlet alatt a kontroll állatok vércukorszintje jelentéktelen ingadozást mutatott (**7. ábra**), míg a diabéteszes csoport vércukorszintje csökkenő tendenciát mutatott (**8. ábra**).

Összehasonlítva a kontroll valamint a diabéteszes csoportot statisztikailag szignifikáns különbséget észleltünk – One Way Anova, illetve Tukey tesztek felhasználásával (**9. ábra**).

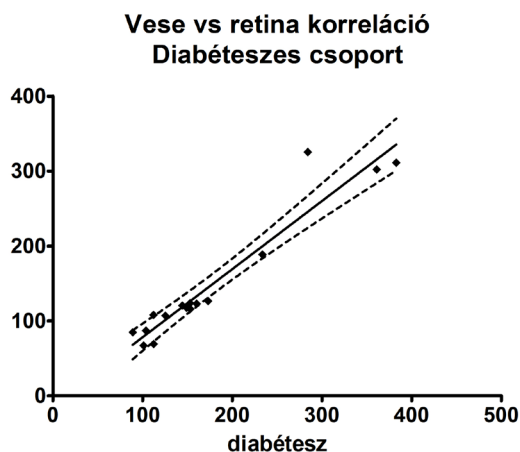


Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?
kontroll vs DnT T	-20.819	12.351	Yes

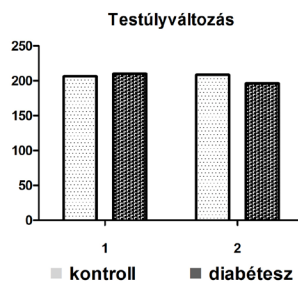
9. ábra. Vércukorszint összehasonlítás a kontroll valamint a diabéteszes csoport között



10. ábra. A fluoreszcein kiáramlás korelációja a retina és a vese szövetek között a kontroll csoport esetében



11. ábra. A fluoreszcein kiáramlás korelációja a retina és a vese szövetek között a diabéteszes csoport esetében



Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
Kontroll vs Diabétesz z	4.250	0.6102	No	ns

12. ábra. A kontroll, valamint a diabéteszes csoportok súlyváltozásának átlagértékei

Összehasonlítva a szövet fluoreszcenciát a retina, valamint a vese szintjén, a szérumban fluoreszcencia függvényében, pozitív korrelációt észleltünk (Pearson-féle korreláció analízis), úgy a kontroll (10. ábra), mint a diabéteszes csoport esetében (11. ábra).

Az állatok súlya alig változott a kontroll csoportnál és csökkenő tendenciát mutatott a diabéteszes csoportnál, de egyik sem volt statisztikailag szignifikáns (12. ábra).

Következtetések, megbeszélés

Célkitűzésünk egy olyan könnyen megvalósítható és reprodukálható kísérleti módszer kidolgozása volt, amely segítségével számos farmakon hatása vizsgálható majd, diabétesz okozta érpermeabilitás-változás szempontjából, úgy a retina mint a vese szintjén.

A fluoreszcencia mérésére több szerző is száloptikás fluoreszcens spektroszkópiát ajánl [17,24], amely mód-

szer igen költséges és nehezen beszerezhető készülékeket igényel. Ezzel szemben az általunk leírt módszer egyszerű, nem igényel drága készülékeket és alkalmazható a különböző szövetek érpermeabilitás-változásának kimutatására és ezek összehasonlítására.

Elsőként hasonlítottuk össze az érpermeabilitás-változást diabéteszben a retina és a vese szöveti között, a szérumban fluoreszcencia függvényében. A kontroll, valamint diabéteszes csoport között statisztikailag szignifikáns különbség volt, úgy a retina, mint a vese szintjén. Összehasonlítva a retina, valamint a vese szövetek fluoreszcenciáját, pozitív korrelációt észleltünk. A retina egyes rétegeinek fluoreszcenciája külön mérhető volt, az átlag pedig összefüggésben volt a szérumban fluoreszcenciával. A módszer használható egyes gyógyszerek érpermeabilitás-változásra kifejtett hatásának vizsgálatára a retina és a vese szintjén.

1. táblázat. A retina, valamint vese szintjén mért szöveti fluoreszcencia átlagai, a szérum fluoreszcencia függvényében

Retina fluoreszcencia		Vese fluoreszcencia	
Kontroll	Diabétesz	Kontroll	Diabétesz
71,737	84,893	34,480	88,999
51,334	108,023	40,747	112,065
73,516	107,016	74,363	283,942
95,569	87,149	91,900	125,399
49,924	67,257	56,289	103,748
63,002	188,630	68,315	101,105
56,071	69,325	77,182	233,631
86,107	117,453	107,959	112,283
58,694	120,504	72,387	148,993
56,728	123,029	85,902	144,357
73,648	116,090	109,099	205,523
59,294	123,813	155,808	160,221
62,349	126,622	85,184	153,000
73,247	62,631	80,608	152,986
44,698	58,275	105,693	175,323
43,262	158,347	176,267	173,043
47,721	67,421		
77,518	68,161		
46,154	60,346		
42,780	157,875		
48,349	66,184		
61,270	66,885		
39,736	62,973		
39,301	167,706		

Irodalom

- Adamis A.P., Miller J.W., Bernal M.T. et al. - *Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy*, Am J Ophthalmol, 1994, 118:445-450.
- Aiello L.P., Avery R.L., Arrigg P.G. et al. - *Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders*, N Engl J Med, 1994, 331:1480-1487.
- Antonetti D.A., Barber A.J., Khin S. et al. - *Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced endothelial occludin content*, Diabetes, 1998, 47:1953-1959.
- Constantinescu D., Pop D.S., Horvath K. et al. - *Laser treatment in diabetic retinopathy*, Revista de Medicina si Farmacie al UMF Tg. Mures, 2009, 55(6):155.
- Cunha-Vaz J., de Abreu J.R.F., Campos A.J. et al. - *Early breakdown of the blood-retinal barrier in diabetes*, Br J Ophthalmol, 1975, 59:649-656.
- Cunha-Vaz J. - *The blood-ocular barriers*, Surv Ophthalmol, 1979, 23:279-296.
- El-Missiry M.A., Othman A.I., Amer M.A. - *L-Arginine ameliorates oxidative stress in alloxan-induced experimental diabetes mellitus*, J Appl Toxicol, 2004, 24(2):93-97.
- Gass J.D.M. - *A fluorescein angiographic study of macular dysfunction secondary to retinal vascular disease*, IV. Diabetic retinal angiopathy, Arch Ophthalmol, 1968, 80:583-591.
- Hernández C., Simó R. - *Strategies for blocking angiogenesis in diabetic retinopathy: from basic science to clinical practice*, Expert Opin Investig Drugs, 2007, 16(8):1209-1226.
- Javitt J.C., Aiello L.P., Chiang Y. - *Preventative eye care in people with diabetes is cost-saving to the federal government. Implications for health care reform*, Diabetes Care, 1994, 17:909-917.
- Jones C.W., Cunha-Vaz J.G., Rusin M.M. - *Vitreous fluorophotometry in the alloxan- and streptozotocin-treated rat*, Arch Ophthalmol, 1982, 100:1141-1145.
- Koya D., King G.L. - *Protein kinase C activation and the development of diabetic complications*, Diabetes, 1998, 47:859-866.
- Moss S.E., Klein R., Klein B.E. - *The 14-year incidence of visual loss in a diabetic population*, Ophthalmology, 1998, 105:998-1003.
- Nishikawa T., Edelstein D., Du X.L. - *Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage*, Nature, 2000, 404:787-790.
- Patz A., Schatz H., Berkow J.W. et al. - *Macular edema - an overlooked complication of diabetic retinopathy*, Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol, 1973, 77:34-42.
- Pinhas-Hamiel O., Zeitler P. - *Acute and chronic complications of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents*, Lancet, 2007, 369:1823-1831.
- Pogue B.W., Burke G. - *Fiber-optic bundle design for quantitative fluorescence measurement from tissue*, Appl Opt, 1998, 37(31):7429-7436.
- Qaum T., Xu Q., Houssen A. - *VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes*, Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42:2408-2413.
- Salgo G., Bermudez E., Squadrito L. - *Peroxynitrite causes DNA damage and oxidation of thiols in rat thymocytes*, Arch Biochem Biophys, 1995, 322:500-505.
- Shakib M., Cunha-Vaz J.G. - *Studies on the permeability of the blood-retinal barrier*, IV., Junctional complexes of the retinal vessels and their role in the permeability of the blood-retinal barrier, Exp Eye Res, 1966, 5:229-234.
- Takeda M., Mori F., Yoshida A. et al. - *Constitutive nitric oxide synthase is associated with retinal vascular permeability in early diabetic rats*, Diabetologia, 2001, 44:1043-1050.
- Vinore S.A., Gadegebeku C., Campochiaro P.A. et al. - *Immunohistochemical localization of blood-retinal barrier breakdown in human diabetics*, Am J Pathol, 1989, 134:231-235.
- Vinore S.A., Campochiaro P.A., Lee A. et al. - *Localization of blood-retinal barrier breakdown in human pathologic specimens by immunohistochemical staining for albumin*, Lab Invest, 1990, 62:742-750.
- Yamal J.M., Cox D.D., Atkinson E.N. et al. - *Repeatability of tissue fluorescence measurements for the detection of cervical intraepithelial neoplasia*, Biomed Opt Express, 2010, 1(2):641-657.