

# Вплив блокади тирозинових протеїнкіназ на експресію васкулоендотеліального фактора росту та розвиток діабетичної ретинопатії

С. В. Зяблицев<sup>1</sup>, В. В. Водяник<sup>1</sup>, О. О. Дядик<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ;

<sup>2</sup>Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, Київ;  
e-mail: zsv1965@gmail.com

*Одним з основних факторів розвитку діабетичної ретинопатії (ДР) вважається васкулоендотеліальний фактор росту (VEGF), який є кінцевим продуктом активації різних сигнальних внутрішньоклітинних шляхів, у тому числі тих, що запускаються при активації рецепторних тирозинових протеїнкіназ. Існує необхідність обґрунтування нових підходів до впливу на експресію VEGF, причому не тільки на пізніх, але й на ранніх етапах ДР. У 45 тримісячних щурів-самців лінії Вістар моделювали цукровий діабет одноразовим введенням стрептозотоцину (50 мг/кг; "Sigma-Aldrich", Китай). Гіперглікемія призводила до розвитку ранніх (на 7–28-му добу) морфологічних проявів ДР, які свідчили про виражені дегенеративні зміни нервових клітин, порушення мікроциркуляції та метаболізму. Використання інсуліну зумовило менші діабетичні зміни сітківки, тоді як комбіноване застосування інсуліну і блокатора тирозинових протеїнкіназ іматинібу попереджувало морфологічні прояви ДР. За результатами імуногістохімічного дослідження у тканинах сітківки спостерігалася надекспресія VEGF, яка гальмувалася при введенні інсуліну і, більшою мірою, комбінацією інсуліну з іматинібом. Слід відмітити у тканинах сітківки, за результатами імуноблотингу, багаторазово збільшувався вміст VEGF і гіпоксііндукованого фактора (HIF-1), що суттєво гальмувалося при застосуванні інсуліну та попереджувалося інсуліном у комбінації з іматинібом. Таким чином, блокада тирозинових протеїнкіназ може бути з високою ефективністю застосована для попередження розвитку та корекції порушень при ДР.*

*Ключові слова: діабетична ретинопатія; імуногістохімія; імуноблотинг; стрептозотоцин; іматиніб.*

## ВСТУП

Діабетична ретинопатія (ДР) є одним з найчастіших ускладнень цукрового діабету (ЦД) і залишається провідною причиною втрати зору та сліпоти в усьому світі [1, 2]. У період з 2015 по 2019 рр. глобальна поширеність ДР серед хворих на ЦД становила 27,0% [3]. Патогенез ДР включає дисфункцію нейронів, мікросудинні ураження з пошкодженням ендотелію, набряком і розвитком запальних реакцій [4, 5].

Недавній прорив у лікуванні ДР був спрямований на гальмування васкулоендотеліального фактора росту (VEGF) через

імуноне зв'язування або інгібування його рецепторів [6]. VEGF, як кінцевий продукт активації різних сигнальних шляхів, вважається основним фактором розвитку ДР [7–9]. Однак анти-VEGF-терапія ефективна тільки на пізніх стадіях ДР та потребує регулярних дороговартісних інтравітреальних ін'єкцій [10]. Відповідно, є необхідність обґрунтування нових підходів до впливу на експресію VEGF, причому не тільки на пізніх, але й на ранніх етапах розвитку ДР.

Ключовим медіатором експресії VEGF є гіпоксііндуцибельний фактор 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ).

Він реалізує свою транскрипційну дію при ішемії/гіпоксії сітківки, яка є одним з наслідків хронічної гіперглікемії [10]. Активація сигнального шляху HIF1 $\alpha$ /VEGF – важливий механізм діабетичного пошкодження сітківки [11].

Нещодавно було відкрито новий клас мембранних рецепторів, які використовують тирозинові протеїнкінази, що здатні фосфорилувати білки за гідроксильними групами тирозину [12, 13]. Це стало початком нової ери вивчення молекулярних основ клітинної регуляції, зокрема, механізмів злоякісної трансформації клітин, оскільки онкогени кодують саме тирозинкінази [14]. Рецептори тирозинкіназ активують декілька сигнальних каскадів [15] і, в тому числі, через мітогенактивовані кінази (Mitogen-activated Protein Kinase – MAPK) – експресію VEGF [16]. Центральною MAP-кіназою є позаклітинна сигналзалежна кіназа (Extracellular Signal-regulated Kinase – ERK). У щурів з індукованою гіперглікемією шлях MAPK/ERK був аномально активованим, що гальмувалося введенням мезенхімальних стовбурових клітин [17], антиоксидантом карнозином [18], поліфенольним флаванолом таксифоліном [19].

Отже, при ДР можна вважати встановленим факт активації шляхів тирозинових протеїнкіназ та позитивний ефект від його гальмування. Відповідно до викладеного, логічним було припустити можливість застосування прямих інгібіторів тирозинових протеїнкіназ при ЦД. Нині такі препарати (наприклад, іматиніб) активно використовуються для лікування онкологічних захворювань [20, 21].

Найбільш прийнятною експериментальною моделлю ЦД є індукування гіперглікемії хімічними агентами, зокрема, стрептозотоцином, який руйнує  $\beta$ -клітини, викликаючи стан інсулінозалежного діабету [22, 23]. Вже через 2 тиж після його введення у сітківці розвивається порушення гематоретинального бар'єра, а пізніше – витончен-

ня зовнішнього ядерного шару і утворення судинних аномалій [24]. Таким чином, наразі з'явилися дані про патологічне значення надмірної активації тирозинових протеїнкіназ при ЦД.

Метою нашої роботи було застосувати інгібітор тирозинових протеїнкіназ, оцінити його вплив на розвиток ДР та стан учасників ланцюгу реалізації їх дії (VEGF, HIF-1 $\alpha$ ).

## МЕТОДИКА

При виконанні роботи керувалися нормами та принципами Директиви 2010/63 ЄС із захисту тварин, Гельсінкської декларації (2008) та вимогами Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№1759-VI від 15.12.2009). Тварин тримали в умовах віварію на стандартному раціоні.

Дослідження проведено на 45 тримісячних щурах-самцях лінії Вістар масою 140–160 г. Експериментальний ЦД моделювали одноразовим внутрішньоочеревинним введенням стрептозотоцину (50 мг/кг; “Sigma-Aldrich”, Китай), розчиненого у холодному 0,1 М цитратному буфері (рН 4,5). Протягом 16 год до виконання ін'єкції тварин не годували, а впродовж 24 год після – поїли 5%-м розчином глюкози. Надалі кожні 3 доби контролювали рівень глікемії за допомогою глюкометра та одноразових тест-смужок (ACCUChek Instant, “Roche”, Німеччина) у крові, забраної з хвостової вени натще. Для контролю дії стрептозотоцину 5 щурам вводили тільки цитратний буфер. Через 3 доби після ін'єкції стрептозотоцину вміст глюкози у крові тварин був не менше ніж 17 ммоль/л, у жодного щура з цитратним буфером вміст глюкози у крові не перевищував 5,7 ммоль/л протягом усього спостереження. Слід зазначити, що у 4 тварин (8,9%) після ін'єкції стрептозотоцину гіперглікемія не розвилася (вміст глюкози у крові не перевищував 6,7 ммоль/л). Ці щури були виключені з експерименту.

Протягом експерименту у тварин відмі-

чено виражену полідипсію, поліурію, кетон- та глюкозурію; тварини суттєво втрачали масу, що дало змогу вважати адекватною застосовану модель відтворення у щурів інсулінозалежного ЦД з кетозом. За тваринами спостерігали 28 діб, летальність протягом цього часу становила 13,3%.

Через 7 діб тварин зі стійкою гіперглікемією сліпим рандомним способом розділили на 3 групи. До 1-ї контрольної групи ввійшло 10 тварин, яким гіперглікемію не лікували. Тварин виводили з експерименту через 7 (4 особини), 14 (3 особини) та 28 (3 особини) діб смертельною ін'єкцією тіопенталу натрію (75 мг/кг) та декапітацією. Також у контрольну групу було включено 5 тварин, яких виводили з експерименту на початку дослідження (у день введення стрептозотцину). До 2-ї групи ввійшло 7 тварин, яким через день внутрішньоочеревинно вводили інсулін короткої дії (Actrapid HM Penfill, "Novo Nordisk A/S", Данія) у дозі 30 Од. Тваринам 3-ї групи (8 особин) крім інсуліну (як і у 2-й групі) щоденно *per os* давали розчин інгібітора протеїназ імаїнібу (Імаїніб Гріндекс 100 мг, "Grindeks", Латвія) у дозі 20 мг/кг у вигляді соше. Тварин 2-ї і 3-ї груп виводили з експерименту на 28-му добу.

Після ін'єкції тіопенталу натрію та декапітації проводили двобічну енуклеацію. Для морфологічних досліджень очі занурювали у 10%-й розчин нейтрального формаліну та заливали в парафін. З парафінових блоків на ротаційному мікротомі HM 325 ("Thermo Shandon", Англія) виготовляли серійні гістологічні зрізи товщиною 2-3 мкм. Для світлооптичних досліджень їх забарвлювали гематоксилином і еозином. Клітини у зовнішньому ядерному шарі (ЗЯШ), внутрішньому ядерному шарі (ВЯШ), шарі гангліонарних клітин (ШГК) підраховували із застосування об'єкта-мікромметра, результати представляли у вигляді числа клітин на 1 мм<sup>2</sup>.

Імуногістохімічне дослідження проводили з використанням моноклональних мишиних антитіл проти VEGF (Monoclonal

Antibody VG1, "Invitrogen", США). Зрізи додатково забарвлювали гематоксилином. Мікроскопічне дослідження та фотоархівування здійснювали із використанням світлооптичних мікроскопів "ZEISS" (Німеччина) з системою обробки результатів "Axio Imager. A2".

Вміст VEGF і HIF-1 $\alpha$  у лізатах тканини сітківки визначали методом імуноблотингу. Зразки тканини витримували у скрапленому азоті, подрібнювали та гомогенізували у 50 ммоль тріс-НСІ буфері (рН 7,4) з додаванням інгібіторів фосфатаз та протеаз (Pierce Protease and Phosphatase inhibitor, "ThermoScientific", США). Електрофорез здійснювали у 8%-му поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію у камері для вертикального гелі-електрофорезу ("BioRad", США). Протеїни з гелю переносили на нітроцелюлозну мембрану за допомогою електроблоту. Мембрани інкубували з моноклональними антитілами до VEGF (no. MA5-12184, mouse, "Invitrogen", США) і HIF-1 $\alpha$  (no. HPA001275, rabbit, "Sigma Aldrich", США). Антитіла до актину ( $\beta$ -actin, no. MA5-15739, mouse, "Invitrogen", США) використовували для його детекції як контролю нанесення протеїну. Після первинної інкубації мембрани відмивали та обробляли антивидовими вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому ("Invitrogen", США). Напівкількісний аналіз проводили денситометрично, використовуючи програмне забезпечення TotalLab (TL120, "Nonlinear Inc", США). Результати імуноблот-аналізу виражали в умовних одиницях від контрольного значення оптичної густини відповідної поліпептидної зони на блотограмі, нормованої за вмістом актину в кожному зразку.

Для статистичного аналізу застосовували програмне забезпечення Statistica 10 ("StatSoft, Inc.", США). Розраховували середні та їх стандартні похибки. Вибіркові середні порівнювали із застосуванням дисперсійного аналізу (ANOVA), вірогідними вважали значення при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Рівень глікемії у тварин контрольної групи протягом спостереження був стабільно високим та на 28-му добу становив  $27,6 \pm 1,0$  ммоль/л, тоді як у тварин 2-ї та 3-ї груп він був значно нижчим –  $16,8 \pm 0,7$  і  $11,1 \pm 0,9$  ммоль/л відповідно ( $P < 0,05$ ).

Морфологічне дослідження сітківки щурів контрольної групи показало наявність певних ознак ДР порівняно з нормальною сітківкою (рис. 1, а). Зокрема, знижувалося число клітин шарів сітківки, спостерігався набряк всіх шарів, що особливо було помітно у внутрішньому плексиформному шарі, дилатація судин з явищами мікротромбоутворення, численні судинні аномалії, ділянки ішемії з вакуолізацією цитоплазми нервових клітин, клітинного набряку, пікнозу ядер. Такі зміни проявлялися у ЗЯШ та ВЯШ вже на 7-му добу гіперглікемії (див. рис. 1, б) та прогресували на 14-ту і 28-му добу (див. рис. 1, в, г). Відмічали суттєве розрідження ядерних шарів, гіпохромію нейронів з вакуолізацією цитоплазми, розрихлення нервових волокон; ектазію венул, ділянки ішемії;

втрату будови зовнішнього та внутрішнього сегментів фоторецепторів. Також спостерігалося розрідження клітин у ШГК, виражену вакуолізацію гангліонарних клітин, що чергувалася з гіперхромією нейронів, пікнозу ядер. Це свідчило про виражені дегенеративні зміни нервових клітин, що відбувалися на тлі порушень мікроциркуляції та метаболізму.

Нейродегенеративні зміни добре відображала діаграма щільності клітин у ядерних шарах сітківки (рис. 2). Щільність клітин у перерахунку на одиницю площі у контрольній групі прогресивно зменшувалася у всіх шарах з 7-ї по 28-му добу спостереження, що особливо було виражено у ВЯШ (до 25,7% від початкового рівня на 28-му добу;  $P < 0,05$ ).

Після введення інсуліну у тварин спостерігали менш виражені діабетичні зміни сітківки (див. рис. 1, д), натомість зберігалося розрідження ядерних шарів, у яких визначалися поширені ділянки набряку, ішемії; клітини з ознаками гіпохромії і вакуолізації цитоплазми; ектазія венул, явища застою крові у зовнішньому плексиформному шарі і ВЯШ; набряк з деструкцією волокон вну-

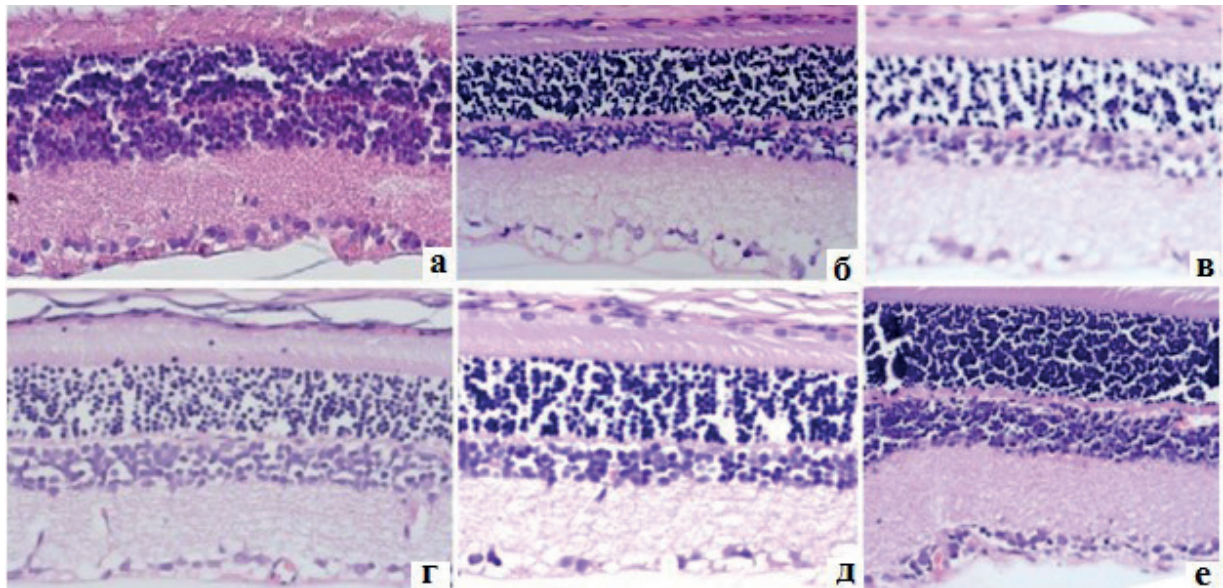


Рис. 1. Стан шарів сітківки контрольної групи (а – на початку дослідження; б – через 7 діб; в – 14 діб, г – 28 діб), а також через 28 діб після ін'єкції інсуліну (д) та комплексного введення інсуліну та імаїнібу (е); забарвлення гематоксилін-еозином;  $\times 200$

трішнього плексиформного шару. Щільність клітин у ядерних шарах сітківки значуще перевищувала таку у контрольній групі (див. рис. 2), але не сягала початкового значення.

Комбіноване введення інсуліну і імаїнібу дало змогу попередити прояви ДР (див. рис. 1, е). Кількість клітин у ядерних шарах фактично не відрізнялася від початкового значення (див. рис. 2). Дистрофія нейронів була виражена менше, однак зберігався незначний набряк усіх шарів, повнокрів'я судинного русла, розрихлення волокон внутрішнього плексиформного шару, порушувалася будова зовнішнього та внутрішнього сегментів фоторецепторів; відмічена ектазія венул зовнішнього плексиформного шару.

Імуногістохімічне дослідження VEGF показало значне посилення його експресії у шарах сітківки за умов хронічної гіперглікемії (рис. 3). Так, уже на 7-му добу у тварин контрольної групи специфічно забарвлені клітини виявлялися на кордонах ВЯШ та у стінці судин хоріоїдального сплетіння (див. рис. 3, а). Найбільш інтенсивно за-

барвлювалися гангліонарні клітини та волокна у внутрішньому плексиформному шарі. Такі явища прогресували на 14-ту добу, коли більшість клітин ВЯШ мали виражене позитивне забарвлення (див. рис. 3, б). У ЗЯШ виявлялися забарвлені дифузно розташовані відросткові клітини, ймовірно – активовані астроцити; у внутрішньому плексиформному шарі – позитивно забарвлені численні мілкі клітини. Через 28 діб у контрольній групі експресія VEGF була значно вираженою майже у всіх шарах сітківки, де виявлялось інтенсивне позитивне забарвлення (див. рис. 3, в). Забарвлювалися ендотелій судин та численні округлі клітини у хоріоїдальному сплетінні, а також внутрішній сегмент фоторецепторів. Найбільш інтенсивну експресію відмічено у поліморфних клітинах зовнішнього плексиформного шару, серед яких знаходилися крупні відросткові та округлі клітини, а також у ВЯШ, де позитивно забарвлювалися нервові волокна та крупні полігональні клітини (ймовірно, біполярні) і численні округлі клітини на кордоні з зовнішнім плексиформним шаром.

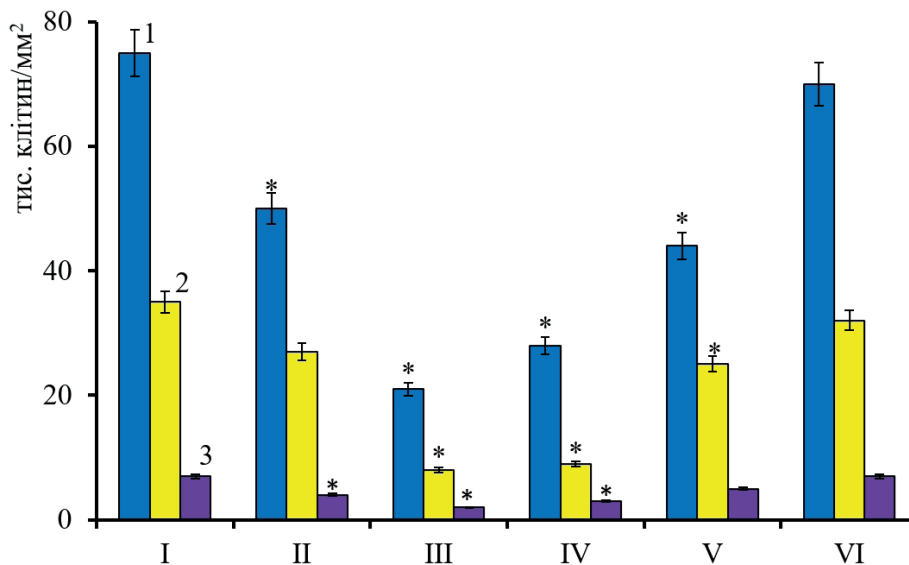


Рис. 2. Середня щільність клітин у шарах сітківки в контрольній групі на початку дослідження (I), через 7 (II), 14 (III) та 28 (IV) діб, а також через 28 діб у тварин, яким вводили інсулін (V) та інсулін разом з імаїнібом (VI); 1 – зовнішній ядерний шар, 2 – внутрішній ядерний шар, 3 – шар гангліонарних клітин; \*P < 0,05 порівняно зі значенням на початку дослідження

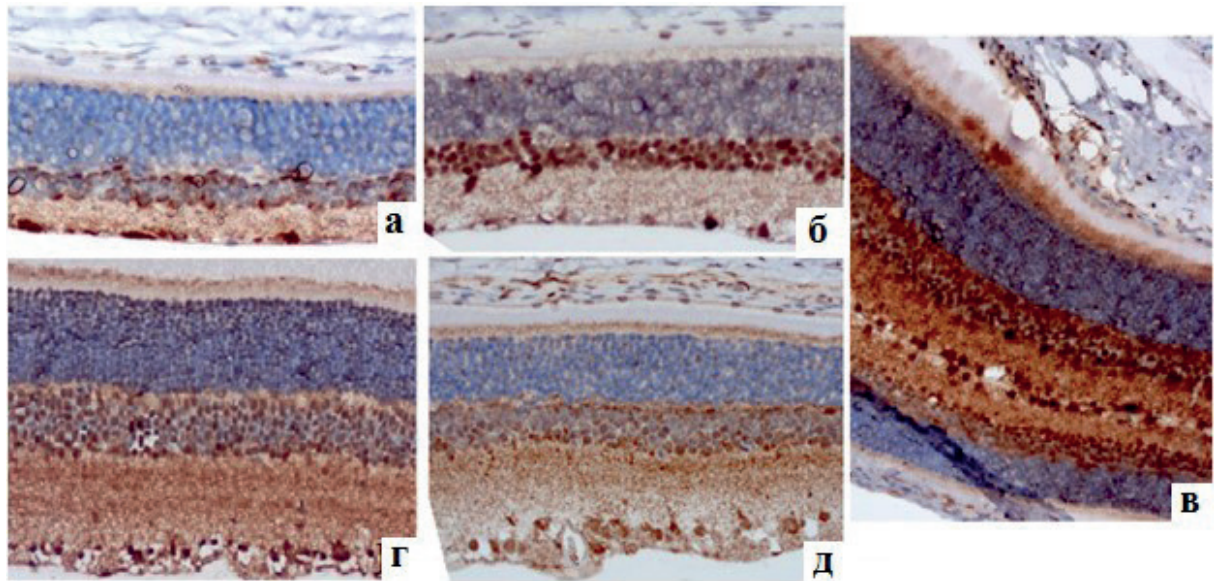


Рис. 3. Мікропрепарати сітківки щура. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження VEGF у контрольній групі через 7 діб (а), 14 діб (б) і 28 діб (в), а також через 28 діб після ін'єкції інсуліну (г) та комплексного введення інсуліну та іматинібу (д); дозобарвлення гематоксилином; а, б, г, д  $\times 200$ ; в  $\times 400$

Вміст VEGF, визначений методом імуноблотингу, був багаторазово збільшеним у сітківці щурів з гіперглікемією (рис. 4). У контрольній групі він збільшувався у 10,3 раза через 7 діб і у 8,6 раза через 28 діб порівняно з початковим значенням ( $P < 0,05$ ). Майже у всіх пробах тварин контрольної групи та групи з введенням інсуліну на блотограмах була наявна смужка на рівні 38 кДа, яка відповідала вмісту мономерної форми VEGF та відображала рівень його синтезу. Ця смужка була відсутньою у пробах сітківки тварин, які отримували інсулін разом з іматинібом.

Введення інсуліну супроводжувалося загальним зниженням інтенсивності експресії VEGF (див. рис. 3, г). Імуноспецифічне забарвлення зберігалось у відросткових веретеноподібних клітинах ЗЯШ, окремих округлих клітинах, розташованих переважно по периферії ВЯШ, волокнах внутрішнього плексиформного шару та гангліонарних клітинах. Вміст VEGF у тканині сітківки за результатами імуноблотингу (див. рис. 4) перевищував початковий у 3,7 раза, але був

значно нижчим, ніж у контролі на 28-му добу (у 2,3 раза;  $P < 0,05$  для обох порівнянь).

Незначна ступінь експресії VEGF була притаманна тваринам з комбінованим введенням інсуліну та іматинібу (див. рис. 3, д). Забарвлення слабкого ступеня відзначено у стінках судин хоріоїдального сплетіння, внутрішньому сегменті фоторецепторів, окремих округлих клітинах ЗЯШ і клітинах, що розташовані по периферії ВЯШ, волокнах внутрішнього плексиформного шару та окремих гангліонарних нейронах. Вміст VEGF у тканинах сітківки за результатами імуноблотингу (див. рис. 4) не відрізнявся від початкового значення ( $P > 0,05$ ).

Враховуючи тісний зв'язок експресії VEGF з активністю транскрипційного фактора HIF-1 $\alpha$  [10, 11], був проаналізований його вміст у тканині сітківки методом імуноблотингу (див. рис. 4). Початковий вміст HIF-1 $\alpha$  майже не відрізнявся від 0, сягаючи 0,00035 ум.од. за відношенням оптичної густини відповідної поліпептидної зони на блотограмах HIF-1 $\alpha$  і актину. Однак уже через 7 діб у тканині сітківки в

контрольній групі він збільшився до  $0,044 \pm 0,008$  ум.од., тобто – у 126 разів, а через 28 діб – до  $2,59 \pm 0,60$  ум.од. Отже, порівняно з початковими значеннями експресія HIF-1 $\alpha$  у тканинах сітківки при хронічній гіперглікемії за 28 діб збільшилася у 7,4 тис. разів.

Застосування інсуліну супроводжувалося меншою активацією експресії HIF-1 $\alpha$ , відношення оптичної густини блотограм HIF-1 $\alpha$  і актину становило  $1,57 \pm 0,08$  ум.од.,

що було статистично нижче за відповідний показник контрольної групи (у 1,6 раза;  $P < 0,05$ ). Комбіноване введення інсуліну та імаїнібу призвело до ще більшого гальмування експресії HIF-1 $\alpha$ . Його вміст становив  $0,042 \pm 0,011$  ум.од, що не відрізнялося від значення на 7-му добу.

За класичними уявленнями ДР являє собою комплекс патологічних прогресуючих змін у мікроциркуляторному руслі, які

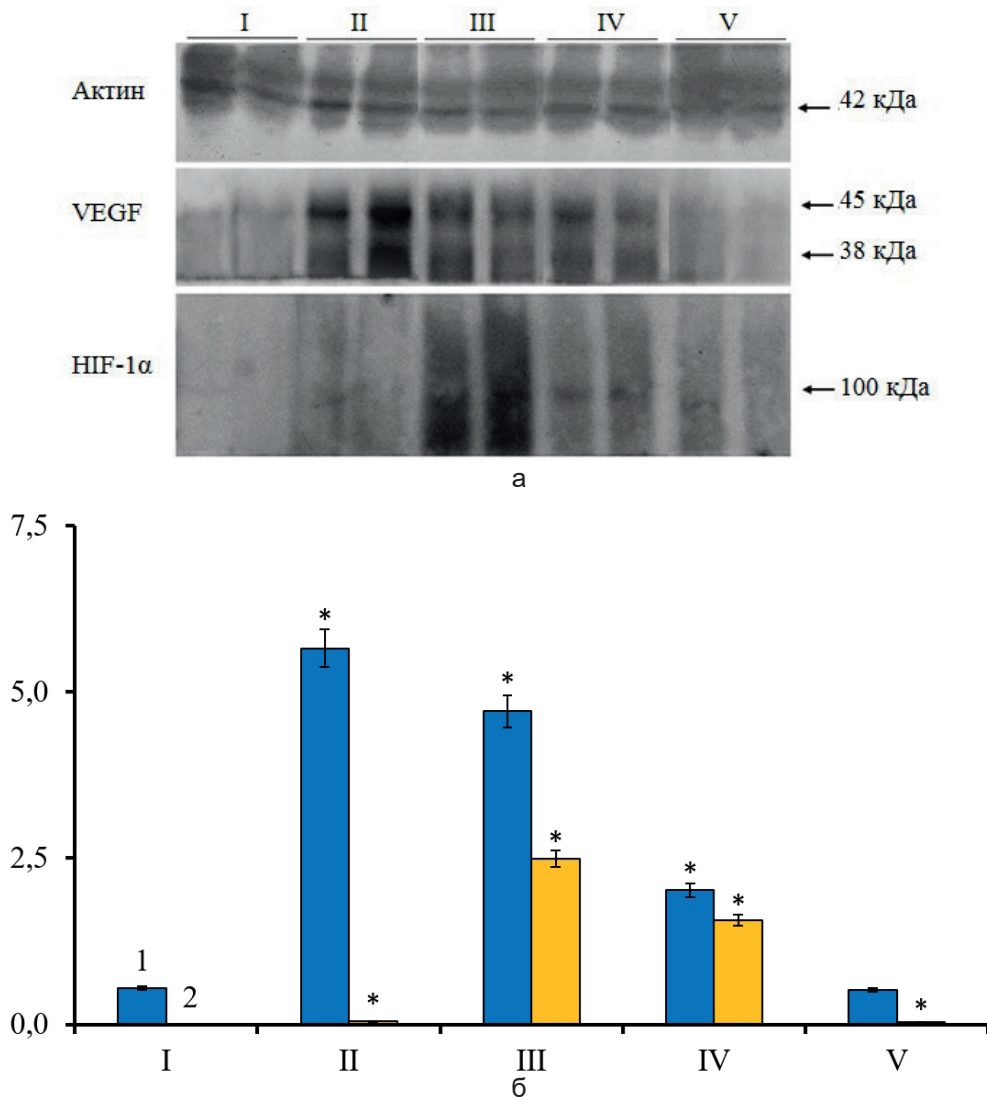


Рис. 4. Співвідношення вмісту VEGF/актин і HIF-1 $\alpha$ /актин у тканині сітківки у контрольній групі на початку дослідження (I), через 7 і 28 діб (II і III відповідно), а також через 28 діб у тварин після введення інсуліну (IV) та інсуліну і імаїнібу (V); а – репрезентативні блотограми актину, VEGF і HIF-1 $\alpha$ ; б – результати денситометричного аналізу блотограм (співвідношення до вмісту актину); \* $P < 0,05$  порівняно зі значенням на початку дослідження

викликають ішемію, неоваскуляризацію, зміни проникності та набряк сітківки [10]. Внутрішня судинна мережа сітківки позбавлена вегетативної іннервації, тому вже на ранніх стадіях ЦД метаболічний стрес порушує місцеві регуляторні механізми, що супроводжується застоєм крові у венулярній частині, мікромтромбоутворенням, сприяє набряку та ішемії сітківки [25]. У наших дослідженнях уже на 7-му добу спостерігався застій крові і екстазія венул зовнішнього плексиформного шару і хоріоїдального сплетіння.

Дисфункція нервово-судинного блоку сприяє таким мікросудинним змінам, як мікроаневризми, мікрокрововиливи, інфаркти нервових волокон (ватні плями), відкладення ексудату (тверді ексудати), безклітинні та неперфузовані капіляри, зміни калібру вен; до зниження цілісності та збільшення проникності судин сітківки [26]. При прогресуванні це призводить до їх оклюзії та утворення неперфузійних зон з ішемією, гіпоксією та інфарктами у шарах нервових волокон. Такі зміни ми спостерігали на 21–28-му добу експерименту у контрольній групі.

Слід зазначити, що гіпоксія активує проангіогенні фактори – VEGF та прозапальні агенти, що призводить до нейрозапалення, судинної гіперпроникності та неоваскуляризації сітківки [10]. Нами показано суттєве збільшення вмісту VEGF у сітківці вже на 7-му добу індукованої гіперглікемії, що передувало розвитку значних судинних порушень. Введення інсуліну супроводжувалося очікуваним зменшенням цього показника, тоді як додаткове застосування імаїнібу повністю попереджувало таке збільшення.

Цитопатологія при діабетичній дисфункції сітківки зачіпає майже всі клітини, включаючи перипіцити, клітини пігментного епітелію сітківки, горизонтальні та біполярні клітини, фоторецептори, амакринові клітини, гангліонарні клітини сітківки, гліальні клітини [27].

Пігментний епітелій за нашими результатами активно експресував VEGF, що було менше виражено при застосуванні інсуліну та

імаїнібу. Клітини пігментного епітелію за умов ЦД здатні до епітеліально-мезенхімального переходу, що має значення для фіброзного ремоделювання [28]. Регулятором цього процесу є шляхи MAPK/ERK/JNK і PI3K/Akt/GSK3 $\beta$ , а їх інгібування – перспективною терапевтичною стратегією при ДР [28].

Експресія VEGF нервовими клітинами мала певну динаміку – на 7-му добу виявлялася по периферії ЗЯШ та у гангліонарних клітинах, на 14-ту – більшість клітин ЗЯШ активно експресувало VEGF, а у зовнішньому плексиформному шарі виявлялися відросткові клітини, ймовірно, активовані астроцити. На 28-му добу майже всі клітини цих шарів мали виражену експресію VEGF. Крім того, вона захоплювала і внутрішній сегмент фоторецепторів. Отже, можна вважати, що згодом у сітківці разом із розрідженням ядерних шарів та іншими ознаками нейродегенерації розвивалася надмірна гіперекспресія VEGF, яка подібно до вибухової хвилі розповсюджувалася на клітинні елементи всіх шарів сітківки. Імаїніб у комбінації з інсуліном суттєво пригнічували її, що дає змогу вважати інгібування тирозинових протеїназ перспективним напрямком корекції надекспресії VEGF, починаючи вже з ранніх стадій ДР.

Особливо слід відзначити виявлену нами у контрольній групі виражену дегенерацію тіл та аксонів гангліонарних клітин. Вони, як відомо, є найбільш вразливими нейронами сітківки і пошкоджуються вже на ранніх стадіях ДР [27]. Додаткове до інсуліну застосування імаїнібу зберігало ці клітини, попереджуючи їх загибель та експресію в них VEGF.

Гліальні клітини сітківки поділяють на три основні категорії: мікроглія та два типи макроглії: клітини Мюллера та астроцити. При гіперглікемічному стресі мікроглія активується, стає амебоїдною і проникає в більш глибокі шари, де виконує множинні запально-репаративні функції, як нейропротекторні, так і ті, що сприяють ушкодженню нейронів внаслідок секреції нейротоксичних та про-



запальних факторів [29]. Наші дослідження не виключають можливості експресії VEGF активованою мікроглією. Це може починатися у ЗЯШ та внутрішньому плексиформному шарі, де збільшена щільність таких клітин за умов гіперглікемії [30].

Залучення клітин Мюллера і астроцитів, які в нормі перебувають у стані спокою, при ДР відбувається пізніше та призводить до розвитку реактивного гліозу [31], який пов'язаний з надекспресією VEGF та прозапальних цитокінів [32]. Дійсно, ці клітини залучалися пізніше (з 14-го дня) але демонстрували максимально виражену експресію VEGF на 28-му добу. З іншого боку, при лікуванні інсуліном та іматинібом саме вони показували відсутність надмірної експресії VEGF.

У нашому дослідженні введення інсуліну супроводжувалося очікуваним зменшенням глікемії, що могло пояснювати зниження експресії VEGF. Вочевидь, що більш виражений ефект іматинібум був зумовлений залученням додаткових механізмів. До таких, імовірно, відноситься активований при ДР сигнальний каскад Ras/Raf-1/MEK/ERK, оскільки кіназа Raf може взаємодіяти з VEGF, посилюючи його дію [33]. Цю думку підтверджує дослідження, в якому показано, що білок-інгібітор кінази Raf-1 попереджає виникнення діабетичної нейродегенерації сітківки внаслідок гальмування шляху p38MAPK [34].

Гіпоксія тканин сітківки є найважливішим фактором у патогенезі ДР, гіперглікемія та гіпоксія взаємодіють та адитивно впливають на початок та прогресування ДР [35]. При тяжкій гіпоксії експресія HIF-1 $\alpha$  і VEGF були підвищені в тканині сітківки гризунів [36]. У наших дослідженнях експресія HIF-1 $\alpha$  у сітківці контрольних щурів з майже нульових початкових значень збільшилася у сотні і тисячі разів вже через 7 і 28 діб, підтверджуючи прогресування гіпоксії. Дія іматинібум блокувала надекспресію HIF-1 $\alpha$ , що вказувало на залучення тирозинових протеїнкіназ до цього регуляторного механізму і можливість позитивного ефекту від їх блокади при ДР.

На думку експертів інгібітори рецепторних тирозинкіназ сунітиніб і іматиніб можуть суттєво доповнити традиційні схеми лікування ДР із застосуванням анти-VEGF-терапії [37]. Комплексний аналіз молекулярних, клітинних та імунологічних механізмів неоваскуляризації при ДР з застосуванням біоінформаційного підходу до перепрофілювання ліків, визначив іматиніб як новий потенційний варіант імуномодуючого препарату для майбутнього лікування ДР [38]. Ці припущення знаходять підтримку у наших результатах, які показали перспективність такого напрямку, як блокада тирозинових протеїнкіназ при ДР та можливість використання вже існуючого препарату іматинібум.

Таким чином, стійка гіперглікемія супроводжувалася розвитком початкової ДР уже на ранніх термінах (7–28 діб) з вираженою наростаючою експресією у сітківці VEGF і HIF-1 $\alpha$ , що гальмувалося введенням інсуліну та, більшою мірою, – інсуліну в комбінації з блокатором тирозинових протеїнкіназ іматинібом. Отже, блокада тирозинових протеїнкіназ може бути з високою ефективністю застосована для попередження розвитку та корекції порушень при ДР.

## ВИСНОВКИ

1. Стрептозотоциніндукована гіперглікемія у щурів призводила до розвитку ранніх морфологічних проявів ДР, зокрема, зниження числа клітин ядерних шарів сітківки, їх набряку, особливо – внутрішнього плексиформного шару; дилатація судин, ділянки ішемії з вакуолізацією цитоплазми нервових клітин, клітинний набряк, пікноз ядер. Такі зміни свідчили про виражену дегенерацію нервових клітин, що відбувалися на тлі порушень мікроциркуляції та метаболізму. Введення інсуліну зумовило менші діабетичні зміни сітківки, тоді як застосування інсуліну разом з блокатором тирозинових протеїнкіназ іматинібом фактично попереджувало прояви ДР.

2. За результатами імуногістохімічного

дослідження у тканинах сітківки спостерігалася надекспресія VEGF, особливо у гангліонарних клітинах, стінці судин та окремих клітинах хоріоїдального сплетіння, внутрішньому сегменті фоторецепторів, великих відросткових та дрібних округлих клітинах і нервових волокнах зовнішнього плексиформного шару та внутрішнього ядерного шару. Введення інсуліну та особливо інсуліну в комбінації з блокаторм тирозинових протеїнкіназ імаїнібом цю надекспресію гальмувало.

3. За результатами імуноблотингу у тканинах сітківки багаторазово збільшувався вміст VEGF і HIF-1, що суттєво гальмувалося при введенні інсуліну та було фактично відсутнім при застосуванні інсуліну в комбінації з імаїнібом.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.*

**S.V. Ziablitsev<sup>1</sup>, V.V. Vodianyuk<sup>1</sup>, O.O. Dyadyk<sup>2</sup>**

#### **THE INFLUENCE OF TYROSINE PROTEIN KINASES BLOCKADE ON THE VASCULONDOTHELIAL GROWTH FACTOR EXPRESSION AND DIABETIC RETINOPATHY DEVELOPMENT**

<sup>1</sup>*Bogomolets National Medical University, Kyiv;*

<sup>2</sup>*Shupyk National University Healthcare of Ukraine, Kyiv; e-mail: zsv1965@gmail.com*

One of the main factors in the development of diabetic retinopathy (DR) is vasculoendothelial growth factor (VEGF), which is the end product of the activation of several intracellular signaling pathways, including those triggered by the activation of receptor tyrosine protein kinases. There is a need to justify new approaches to influence the expression of VEGF, not only in the late but also in the early stages of DR. Diabetes was modeled in 45 three-month-old male Wistar rats by a single injection of streptozotocin (50 mg/kg; Sigma-Aldrich, China). Hyperglycemia led to the development of early (on the 7–28th day) morphological manifestations of DR, indicating pronounced degenerative changes in nerve cells, microcirculation, and metabolism disorders. The use of insulin resulted in fewer diabetic changes in the retina, while

the combined use of insulin and the tyrosine protein kinase blocker imatinib prevented the morphological manifestations of DR. According to the results of an immunohistochemical study, overexpression of VEGF was observed in the retinal tissue, which was inhibited by the introduction of insulin and, to a greater extent, by the combination of insulin with imatinib. According to immunoblotting results, the levels of VEGF and hypoxia-inducible factor (HIF-1) in the retinal tissue increased several-fold, which was significantly inhibited by insulin and prevented by insulin in combination with imatinib. Thus, this suggests that blockade of tyrosine protein kinases may be a highly effective way of preventing or correcting the damage caused by DR.

**Key words:** diabetic retinopathy; immunohistochemistry; immunoblotting; streptozotocin; imatinib

#### **REFERENCES**

1. Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linnenkamp U, Guariguata L, Cho NH, Cavan D, Shaw JE, Makaroff LE. IDF diabetes atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017 Jun;128:40-50.
2. Wong TY, Sabanayagam C. Strategies to tackle the global burden of diabetic retinopathy: From epidemiology to artificial intelligence. *Ophthalmologica.* 2020;243(1):9-20.
3. Thomas RL, Halim S, Gurudas S, Sivaprasad S, Owens DR. IDF Diabetes Atlas: A review of studies utilising retinal photography on the global prevalence of diabetes related retinopathy between 2015 and 2018. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019 Nov;157:107840.
4. Antonetti DA, Silva PS, Stitt AW. Current understanding of the molecular and cellular pathology of diabetic retinopathy. *Nat Rev Endocrinol.* 2021 Apr;17(4):195-206.
5. Mykheitseva IM, Molchaniuk NI, Abdulhadi Muhammad, Kolomiichuk SG, Suprun OO. Ultrastructural changes in the chorioretinal complex of the rat after inducing form-deprivation axial myopia only, diabetic retinopathy only and diabetic retinopathy in the presence of myopia. *J Ophthalmol (Ukraine).* 2021;4:72-8.
6. Maturi RK, Glassman AR, Josic K, Antoszyk AN, Blodi BA, Jampol LM, et al. DRCR retina network. Effect of intravitreal anti-vascular endothelial growth factor vs sham treatment for prevention of vision-threatening complications of diabetic retinopathy: The Protocol W Randomized Clinical Trial. *JAMA Ophthalmol.* 2021 Jul 1;139(7):701-12.
7. Podkowinski D, Orłowski-Wimmer E, Zlabinger G, Pollreis A, Mursch-Edlmayr AS, Mariacher S, Ring M, Bolz M. Aqueous humour cytokine changes during a loading phase of intravitreal ranibizumab or dexamethasone implant in diabetic macular oedema. *Acta Ophthalmol.* 2020 Jun;98(4):e407-e415.
8. Mehrabadi ME, Salemi Z, Bahaie S, Panahi M. Effect of Biochanin A on retina levels of vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-

- Ibeta in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Can J Diabet.* 2018 Dec;42(6):639-44.
9. Yenihayat F, Özkan B, Kasap M, Karabaş VL, Güzel N, Akpınar G, Pirhan D. Vitreous IL-8 and VEGF levels in diabetic macular edema with or without subretinal fluid. *Int Ophthalmol.* 2019 Apr;39(4):821-8.
  10. Wang W, Lo ACY. Diabetic retinopathy: Pathophysiology and treatments. *Int J Mol Sci.* 2018 Jun 20;19(6):1816.
  11. Huang H, He J, Johnson D, Wei Y, Liu Y, Wang S, Luttly GA, Duh EJ, Semba RD. Deletion of placental growth factor prevents diabetic retinopathy and is associated with Akt activation and HIF1 $\alpha$ -VEGF pathway inhibition. *Diabetes.* 2015 Jan;64(1):200-12.
  12. Gavi S, Shumay E, Wang H, Malbon C. G-protein-coupled receptors and tyrosine kinases: crossroads in cell signaling and regulation. *Trends Endocrinol Metab.* 2006;17(2): 46-52.
  13. Maruyama IN. Mechanisms of activation of receptor tyrosine kinases: monomers or dimers. *Cells.* 2014 Apr 22;3(2):304-30.
  14. Siddle K. Molecular basis of signaling specificity of insulin and IGF receptors: neglected corners and recent advances. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012 Feb 28;3:34.
  15. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2010 Jun 25;141(7):1117-34.
  16. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrin Rev.* 2001; 22(2):153-83.
  17. Liu Y, Chen J, Liang H, Cai Y, Li X, Yan L, Zhou L, Shan L, Wang H. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells not only ameliorate blood glucose but also protect vascular endothelium from diabetic damage through a paracrine mechanism mediated by MAPK/ERK signaling. *Stem Cell Res Ther.* 2022 Jun 17;13(1):258.
  18. Guo Y, Guo C, Ha W, Ding Z. Carnosine improves diabetic retinopathy via the MAPK/ERK pathway. *Exp Ther Med.* 2019 Apr;17(4):2641-7.
  19. Liu F, Ma Y, Xu Y. Taxifolin shows anticataractogenesis and attenuates diabetic retinopathy in STZ-diabetic rats via suppression of aldose reductase, oxidative stress, and MAPK signaling pathway. *Endocr Metab Immun Disord Drug Targets.* 2020;20(4):599-608.
  20. Hymowitz SG, Malek S. Targeting the MAPK pathway in RAS mutant cancers. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018 Nov 1;8(11):a031492.
  21. Waller CF. Imatinib Mesylate. *Recent Results Cancer Res.* 2018;212:1-27.
  22. Al-Awar A, Kupai K, Veszelka M, Szűcs G, Attieh Z, Murlasits Z, et al. Experimental diabetes mellitus in different animal models. *J Diabetes Res.* 2016;2016:9051426.
  23. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 2008 Feb;51(2):216-26.
  24. Olivares AM, Althoff K, Chen GF, Wu S, Morrisson MA, DeAngelis MM, Haider N. Animal models of diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep.* 2017 Aug 24;17(10):93.
  25. Newman EA. Functional hyperemia and mechanisms of neurovascular coupling in the retinal vasculature. *J Cerebr Blood Flow Metab.* 2013 Nov;33(11):1685-95.
  26. Arboleda-Velasquez JF, Valdez CN, Marko CK, D'Amore PA. From pathobiology to the targeting of pericytes for the treatment of diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep.* 2015 Feb;15(2):573.
  27. Ren J, Zhang S, Pan Y, Jin M, Li J, Luo Y, Sun X, Li G. Diabetic retinopathy: Involved cells, biomarkers, and treatments. *Front Pharmacol.* 2022 Aug 9;13:953691.
  28. Shukal D, Bhadresha K, Shastri B, Mehta D, Vasavada A, Johar K Sr. Dichloroacetate prevents TGF $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2020 Aug;197:108072.
  29. Chang KC, Shieh B, Petrash JM. Role of aldose reductase in diabetes-induced retinal microglia activation. *Chem Biol Interact.* 2019 Apr 1;302:46-52.
  30. Lechner J, O'Leary OE, Stitt AW. The pathology associated with diabetic retinopathy. *Vision Res.* 2017 Oct;139:7-14.
  31. Sundstrom JM, Hernández C, Weber SR, Zhao Y, Dunklebarger M, Tiberti N, Laremore T, Simó-Servat O, Garcia-Ramirez M, Barber AJ, Gardner TW, Simó R. Proteomic analysis of early diabetic retinopathy reveals mediators of neurodegenerative brain diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018 May 1;59(6):2264-74.
  32. Xu J, Chen LJ, Yu J, Wang HJ, Zhang F, Liu Q, Wu J. Involvement of advanced glycation end products in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Cell Physiol Biochem.* 2018;48(2):705-17.
  33. Mohammad G, Kowluru RA. Diabetic retinopathy and signaling mechanism for activation of matrix metalloproteinase-9. *J Cell Physiol.* 2012 Mar;227(3):1052-61.
  34. Wu C, Xu K, Liu W, Liu A, Liang H, Li Q, Feng Z, Yang Y, Ding J, Zhang T, Liu Y, Liu X, Zuo Z. Protective effect of Raf-1 kinase inhibitory protein on diabetic retinal neurodegeneration through P38-MAPK pathway. *Curr Eye Res.* 2022 Jan;47(1):135-42.
  35. Ekberg NR, Eliasson S, Li YW, Zheng X, Chatzidionysiou K, Falhammar H, Gu HF, Catrina SB. Protective effect of the HIF-1A Pro582Ser polymorphism on severe diabetic retinopathy. *J Diabet Res.* 2019 May 12;2019:2936962.
  36. Kaur C, Sivakumar V, Foulds WS. Early response of neurons and glial cells to hypoxia in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006 Mar;47(3):1126-41.
  37. Striglia E, Caccioppo A, Castellino N, Reibaldi M, Porta M. Emerging drugs for the treatment of diabetic retinopathy. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2020 Sep;25(3):261-71.
  38. Boneva SK, Wolf J, Hajdú RI, Prinz G, Salié H, Schlecht A, et al. In-depth molecular characterization of neovascular membranes suggests a role for hyalocyte-to-myofibroblast transdifferentiation in proliferative diabetic retinopathy. *Front Immunol.* 2021 Nov 2;12:757607.

*Матеріал надійшов  
до редакції 12.07.2023*