

Вплив бензодіазепінових рецепторів на стан глії при розвитку діабетичної ретинопатії

С. В. Зяблицев¹, Д. Б. Жупан¹, О. О. Дядик²

¹Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ;

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

Діабетична ретинопатія – прогресуюче специфічне нейроваскулярне ускладнення цукрового діабету з багатофакторним патогенезом, в якому мікросудинним порушенням передують ушкодження нервових елементів. Останні розпочинаються із раннього залучення глії, у тому числі астроцитів та клітин Мюллера. Враховуючи встановлення ГАМК-ергічного дефіциту перспективним здається застосування модуляторів ГАМК-бензодіазепінового рецепторного комплексу, наприклад, карбацетаму, який виявив задовільні нейропротективні властивості. Цукровий діабет моделювали одноразовим введенням стрептозоцину (50 мг/кг; “Sigma-Aldrich”, Кутаї) тримісячним щуром-самцям лінії Вістар. Вже через 7 діб за результатами імуногістохімічного виявлення гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) був визначений реактивний гліоз астроцитів внутрішніх шарів сітківки, до якого з 14-ї доби долучалися клітини Мюллера. Вміст GFAP у тканинах сітківки суттєво зростає. GFAP-позитивні клітини тісно контактували з вогнищами патологічного ангиогенезу внутрішніх шарів сітківки, а також брали участь в утворенні фіброзних проліфератів у зовнішніх шарах. Виявлення каспази-3 показало активацію апоптозу в астроцитах та радіальних відростках клітин Мюллера у внутрішньому плексиформному шарі. Карбацетам у комбінації з інсуліном знижував експресію GFAP та каспази-3 у сітківці та попереджував розвиток реактивного гліозу, ангиогенезу та утворення фіброзних проліфератів, що дає підставу вважати його кандидатом для подальших досліджень лікування діабетичної ретинопатії.

Ключові слова: карбацетам; імуногістохімія; імуноблотинг; гліальний фібрилярний кислий протеїн (GFAP); реактивний гліоз; каспаза-3; стрептозоцин.

ВСТУП

Одним із найчастіших ускладнень цукрового діабету (ЦД) є діабетична ретинопатія (ДР), яка вражає майже третину таких хворих і є основною причиною сліпоти серед дорослого працездатного населення [1, 2]. У період з 2015 по 2019 рр. глобальна поширеність ДР серед хворих на ЦД становила 27,0%, у тому числі 25,2% – непроліферативна ДР (НПДР), 1,4% – проліферативна ДР (ПДР) та 4,6% – діабетичний макулярний набряк. Нині ДР вважають прогресуючим специфічним нейроваскулярним ускладненням ЦД з багатофакторним патогенезом, що супроводжується мікросудинними ураженнями, які провокують дисфункцією нейронів [3, 4].

© Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, 2023

© Видавець ВД “Академперіодика” НАН України, 2023

ISSN 2522-9028 Фізіол. журн., 2023, Т. 69, № 6

Згідно з єдиною теорією діабетичних ускладнень Браунлі, вони індукуються окисно-відновними процесами та епігенетичними змінами у сприйнятливих клітинах та тканинах [5]. Нестійка гіперглікемія призводить до надвиробництва мітохондріями супероксиду і утворення активних форм кисню, які опосередковують клітинну дисфункцію, гіпертрофію, проліферацію, ремоделювання та апоптоз. Ці внутрішньоклітинні процеси спричиняють взаємозалежний розвиток гліальної, нервової та мікросудинної дисфункції [6]. У відповідь на накопичення токсичних метаболічних продуктів відбувається проліферація мікроглії та її трансформація від протизапального до прозапального стану

[7]. Активована мікроглія залучає клітини Мюллера та астроцити (в нормі знаходяться у стані спокою), що супроводжується розвитком реактивного гліозу, маркером якого є гліальний фібрилярний кислий протеїн (GFAP) [8]. Реактивний гліоз так само посилює надекспресію прозапальних цитокінів, збільшує проникність мікросудин сітківки та їх проліферацію в ішемізованих ділянках [9]. Хронічна або надмірна активація гліальних клітин Мюллера має суттєву токсичну дію на гангліонарні клітини [10].

З ушкодженням глії при ДР тісно пов'язані нейрохімічні механізми, найважливішим з яких є збуджуюча токсичність глутамату, що підсилює процеси метаболізму, каспазного каскаду й апоптозу [11]. Моделі діабету на гризунах демонструють зниження вивільнення γ -аміномасляної кислоти (ГАМК), посилення збуджуючої передачі сигналів глутамату та зниження сигналізації дофаміну, що свідчить про специфічний дефіцит нейронів сітківки [11].

Бензодіазепіни є агоністами рецепторів ГАМК, що підсилюють її гальмівний ефект [12, 13]. Серед них значної уваги заслуговує карбацетам, розроблений в Інституті фізико-органічної хімії та вуглехімії НАН України. Він належить до ендогенних модуляторів ГАМК-бензодіазепінового рецепторного комплексу, похідних β -карболіну та являє собою карболіновий ізостер (1-оксо-3,3,6-триметил-1,2,3,4-тетрагідроіндоло [2,3-с] хінолін). Препарат проявляє антиамнестичну, анксіолітичну, антигіпоксичну, протинабрякову і протишокову дії і може стати перспективним засобом нейропротекції [14–16]. Розуміння механізмів формування ушкодження нервових елементів сітківки при ДР обґрунтовує нові напрямки патогенетичного, спрямованого на полегшення нейрональної дисфункції лікування.

Метою нашої роботи було з'ясування ранніх реакцій глії в процесі формування ДР та вплив карбацетама.

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.

ЦД моделювали у 35 тримісячних щурах-самцях лінії Вістар масою 140–160 г одноразово внутрішньоочеревинною ін'єкцією стрептозотоцину (50 мг/кг; “Sigma-Aldrich”, Китай). Тварин розділили на 3 групи: контрольну і дві дослідні. Тваринам дослідних груп вводили внутрішньоочеревинно через день упродовж 28 діб, починаючи з 7-го дня після ін'єкцій стрептозотоцину, інсулін (1-ша група, Actrapid HM Penfill, “Novo Nordisk A/S”, Данія) та інсулін із карбацетамом (2-га група; 5 мг/кг у 0,5 мл фізіологічного розчину). В контрольній групі використано тільки розчинники. Карбацетам синтезували у відділі хімії біологічно активних сполук Інституту фізико-органічної хімії та вуглехімії імені Л.М. Литвиненка НАН України (Київ, Україна) під керівництвом доктора хімічних наук, старшого наукового співробітника С.Л. Богзи.

Вміст глюкози контролювали за допомогою глюкометра та одноразових тест-смужок (ACCU-Chek Instant, “Roche”, Німеччина) у крові, забраної з хвостової вени натще. У тварин всіх груп протягом спостереження вміст глюкози у крові був стабільно високим. На 28-у добу у контрольній групі він становив $29,32 \pm 1,25$ ммоль/л, у 1-й та 2-й групах $17,02 \pm 1,03$ і $14,38 \pm 1,25$ ммоль/л відповідно ($P < 0,05$).

Через 7, 14, 21 і 28 днів тварин виводили з експерименту смертельною ін'єкцією тіопенталу (75 мг/кг) та декапітацією. 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.

Імуногістохімічне дослідження проводили з використанням моноклональних мишиних антитіл до GFAP і каспази-3 (“ThermoFisher Scientific”, США). Зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном. Мікроскопію та фотоархівування здійснювали з використанням світлооптичних мікроскопів “ZEISS” (Німеччина) з системою обробки результатів “Axio Imager. A2”.

Вміст GFAP у лізатах тканини сітківки визначали методом імуноблотингу. Зразки тканини витримували у скрапленому азоті, подрібнювали та гомогенізували у 50 ммоль трис-НСІ-буфері (рН 7,4) з додаванням інгібіторів фосфатаз та протеаз (“ThermoScientific”, США). Електрофорез здійснювали у 8%-му поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію у камері для вертикального гель-електрофорезу (“BioRad”, США). Протеїни з гелю переносили на нітроцелюлозну мембрану за допомогою електроблоту. Мембрани інкубували з моноклональними антитілами до GFAP (“Santa Cruz Biotechnology”, США). Антитіла до актину (“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 за допомогою програмного 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, використовуючи дисперсійний аналіз (ANOVA). Вірогідними вважали значення при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Розподіл GFAP-позитивного забарвлення сітківки на різних термінах дослідження представлено на рис. 1. На 7-му добу окремі імунопозитивні клітини, ймовірно астроцити, та їх відростки виявлялися тільки у шарах гангліонарних клітин та нервових волокон (див. рис. 1а, б).

На 14-ту добу (див. рис. 1, в) інтенсивність специфічного забарвлення у цих шарах збільшувалася – фактично на всій протяжності шару нервових волокон спостерігалася щільна смужка поздовжніх коричневих волокон. Крім того, визначалися чіткі GFAP-позитивні радіальні волокна, які через внутрішній плексиформний шар прямували до внутрішнього ядерного шару, де були помітні численні GFAP-позитивні відросткові клітини. Ймовірно, ця картина відображала залучення клітин Мюллера які, на відміну від астроцитів у нормі слабо експресують GFAP, але активуються при ЦД [17].

При використанні інсуліну (див. рис. 1, г) відмічено слабкішу інтенсивність забарвлення GFAP-позитивних клітин та волокон, що могло відповідати меншому ступеню метаболічних порушень у тварин цієї групи. Застосування інсуліну з карбацетамом супроводжувалося слабшою порівняно з контрольною групою інтенсивністю GFAP-позитивного забарвлення (див. рис. 1, д).

Окремо слід зазначити, що з 14-ї доби у сітківці виявлялися мікроаневризми та вогнища ангіогенезу (чорна стрілка на рис. 1, г), які мали значно розширені судини з проліферацією ендотелію та, інколи, утворення декількох мікросудинних просвітів, щільно розташованих один до одного і огорнутих товстою периваскулярною мембраною, що відповідало першим клінічним проявам НППДР (мікроангіоми та невеликі точкові кровотечі) [18]. З цими судинами щільно контактували GFAP-позитивні відростки.

Через 21 день у контрольній групі експресія GFAP наростала зі збільшенням щіль-

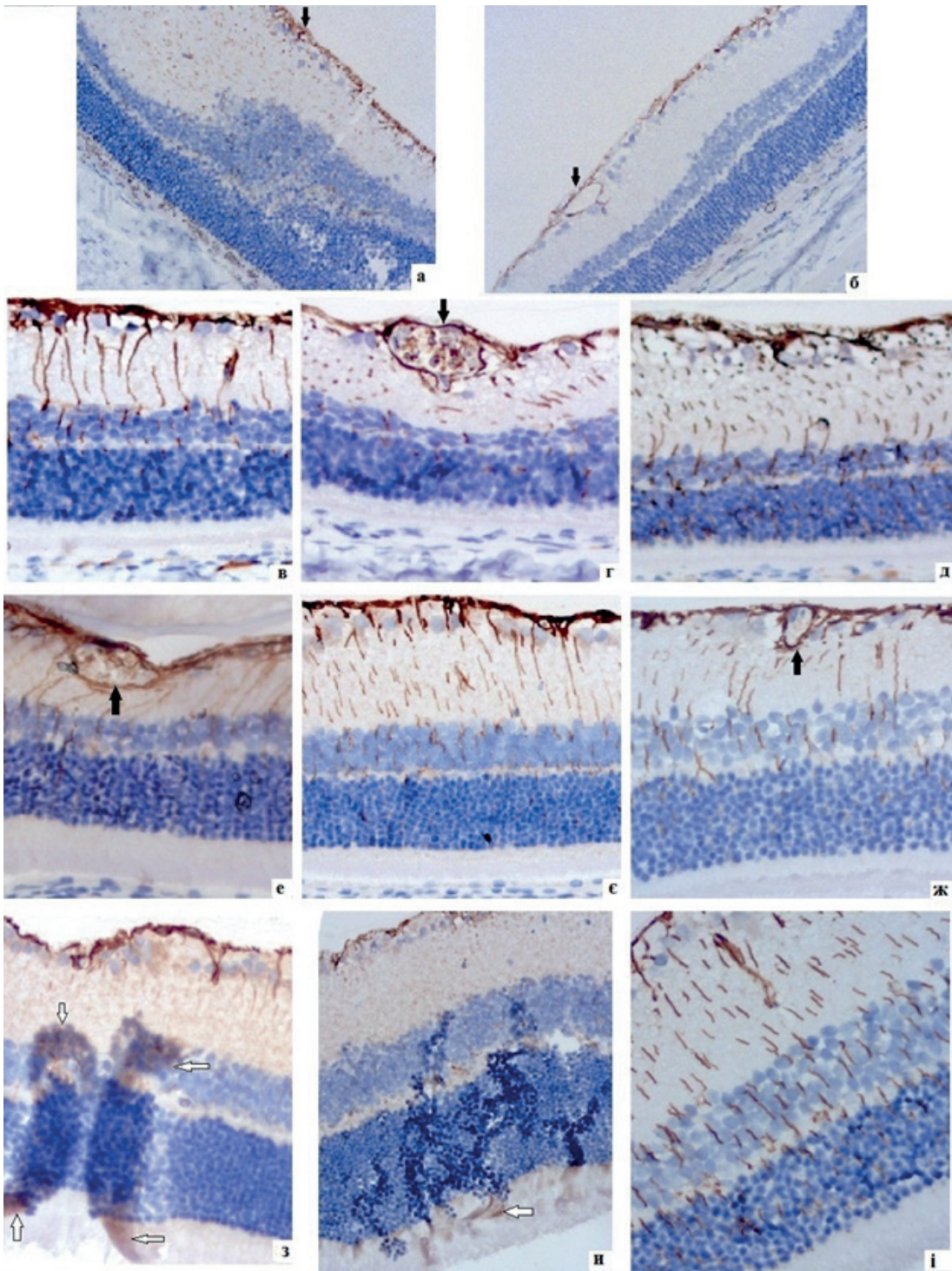


Рис. 1. Мікропрепарати сітківки щура. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження GFAP, дозabarвлен-
ня гематоксиліном; а, б – збільшення у 200 разів; в–і – у 400 разів; а, б – контрольна група, 7 діб; в, г, д – 14-та доба; е,
е, ж – 21-ша доба; з, и, і – 28-ма доба; в, е, з – контрольна група, г, е, и – введення інсуліну, д, ж, і – введення інсуліну і
карбацетаму. Примітки: чорні стрілочки на а, б – імунопозитивне забарвлення у шарі нервових волокон; чорні стрілочки
на г, е, ж – мікроангіоми сітківки; білі стрілочки на з, и – імунопозитивні волокна у вогнищах фіброзної проліферації

ності радіальних волокон, які розрослися у зовнішні шари сітківки (див. рис. 1, е). Застосування інсуліну окремо та у комбінації з карбацетамом зменшувало інтенсивність GFAP-позитивного забарвлення (див. рис. 1, є, ж).

Дуже цікаве явище було виявлено на 28-й день у зовнішніх шарах сітківки в контрольній групі (див. рис. 1, з). Ще на попередніх термінах у зовнішньому ядерному шарі з'являлися інтенсивно базofilні округлі клітини, які формували окремі групи. Через 28 діб вони утворювали чіткі проліферати, які проросли за межі цього шару. В середині проліфератів концентрувалися GFAP-позитивні волокна (білі стрілки на рис. 1, з), що, ймовірно, було відображенням гліально-

мезенхімального переходу клітин Мюллера, який є основним фіброгенним механізмом при ДР [19]. Під дією трофобластичного фактора росту (TGF- β) на тлі надекспресії васкулоендотеліального фактора росту (VEGF) гліальні клітини Мюллера переходили у міофібробласти.

У експерименті дія інсуліну знижувала інтенсивність GFAP-позитивного забарвлення сітківки, та гальмувала розвиток вогнищ ангиогенезу та фіброзних проліфератів сітківки що було притаманне і сумісній дії інсуліну з карбацетамом (див. рис. 1, и, і).

Результати імуногістохімічного дослідження були кількісно підтверджені імуноблотингом (рис. 2). Вміст GFAP у тканині сітківки контрольної групи суттєво зростає на 7-му

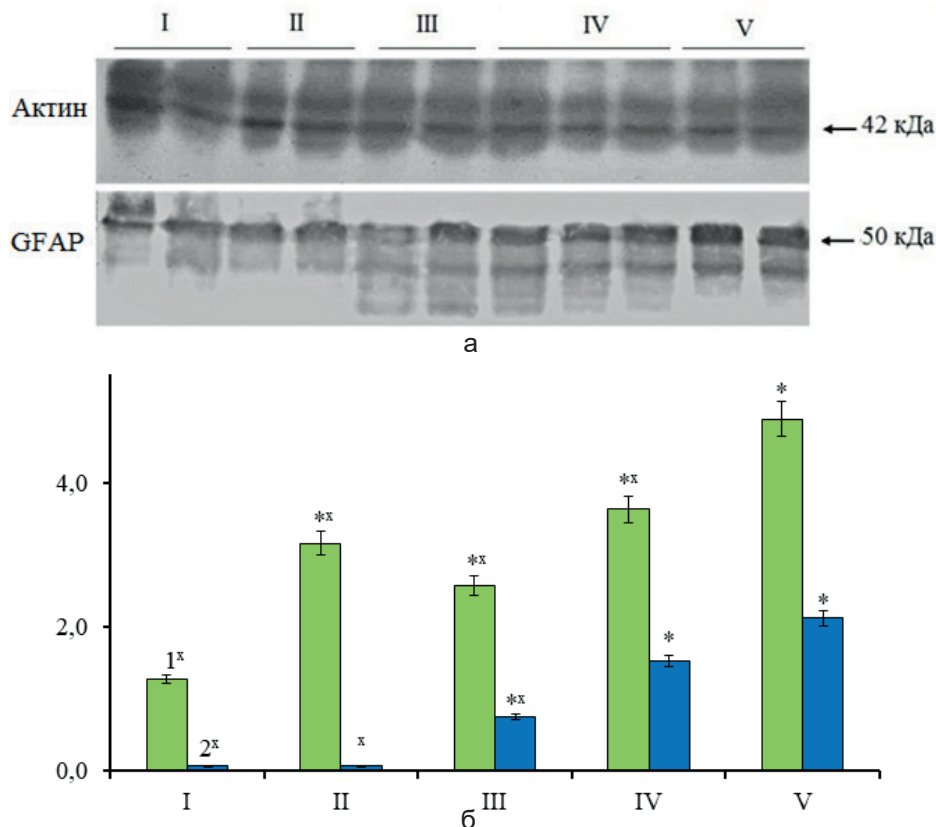


Рис. 2. Вміст GFAP (1) і продуктів його фрагментації (2) у тканині сітківки у контрольній групі на початку дослідження (I), через 7 і 28 діб (II і V відповідно), а також через 28 діб при введенні інсуліну (III) та інсуліну з карбацетамом (IV); а – репрезентативні блотограми актину і GFAP; б – результати денситометричного аналізу блотограм GFAP і продуктів його фрагментації (співвідношення до вмісту актину); *P < 0,05 порівняно зі значенням на початку дослідження; **P < 0,05 порівняно з контролем на 28-му добу

і 28-му добу (в 2,5 та в 3,8 раза відповідно порівняно з початковим рівнем; $P < 0,05$), тоді як при застосуванні інсуліну його приріст на 28-му добу був значно меншим (перевищував контрольні значення в 1,9 раза; $P < 0,05$). Застосування інсуліну з карбацетамом також супроводжувалося меншим приростом вмісту GFAP, але він був дещо вищим від такого при введенні лише інсуліну (див. рис. 2, б).

Як видно з рис. 2, а, на блотограмах проб, що були взяті через 28 діб, крім характерної для протеїну GFAP смужки з масою 50 кДа виявлялася додаткова смужка з меншою молекулярною масою (<50 кДа), яка відповідала продуктам його фрагментації. Це висвітлювало особливість метаболізму GFAP при ДР у щурів та додатково підтверджувало більшу активацію гліальних елементів сітківки.

Тісний зв'язок надекспресії GFAP і апоптозу глії за умов розвитку ДР став обґрунтуванням імуногістохімічного дослідження ефекторного проапоптотичного ензиму каспази-3 у сітківці. Порівнюючи результати виявлення GFAP і каспази-3 (рис. 3) можна було чітко визначити активацію апоптозу у тих самих відросчатих клітинах (астроцитах) шару гангліонарних клітин (чорні стрілочки на рис. 3, б) та у радіальних волокнах внутрішнього плексиформного шару (відростки мюллерових клітин).

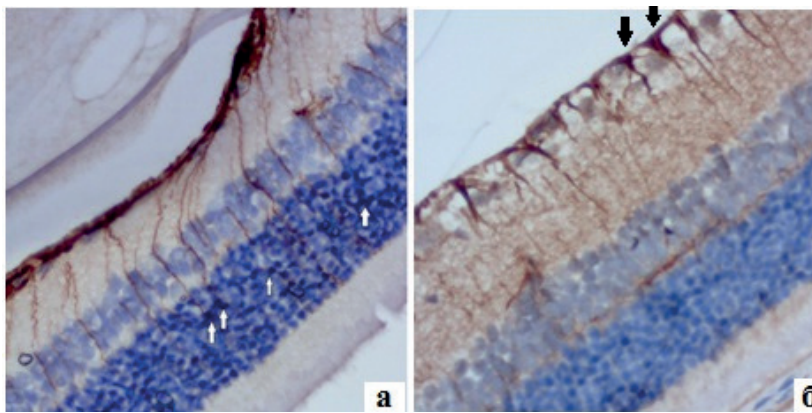


Рис. 3. Мікропрепарати сітківки щура; контрольна група, 21-ша доба. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження GFAP (а) та каспази-3 (б), дозабарвлення гематоксиліном; збільшення у 400 разів. Примітки: білі стрілки на а – скупчення округлих базофільних клітин у зовнішньому ядерному шарі (початок фіброзної проліферації); чорні стрілки на б – апоптотичні клітини та їх відростки у шарі гангліонарних клітин

Крім того, було порівняно експресію каспази-3 у сітківці у групах тварин (рис. 4). В контрольній групі інтенсивне імуноспецифічне забарвлення виявлялося у стінці судин (ендотелії) внутрішніх шарів сітківки, які утворювали численні мікроаневризми з ознаками ангиогенезу (чорні стрілки на рис. 4, а). У ендотелії капілярів таких судин спостерігалось інтенсивне імунопозитивне забарвлення, що свідчило про активацію апоптозу цих клітин. Також позитивними були клітини і радіальні волокна у внутрішньому плексиформному шарі, відображаючи активність апоптозу у астроцитах та їх відростках. У зовнішніх шарах сітківки утворювалися фіброзні проліферати, клітини яких також мали імуноспецифічне забарвлення (білі стрілки на рис. 4, а). Отже, процеси апоптозу супроводжували розвиток патологічних проявів сітківки при ДР. Вплив інсуліну та карбацетаму попереджував розвиток проявів ДР, інтенсивність імуноспецифічного забарвлення каспази-3 була меншою і визначалася тільки у внутрішніх шарах сітківки (див. рис. 4, б, в).

Таким чином, нами було встановлено, що при розвитку ДР експресія гліального маркера GFAP прогресивно збільшувалася. GFAP-позитивні клітини та волокна виявлялися на 7-му добу у шарі нервових волокон,

з 14-ї доби – у вигляді радіальних волокон у внутрішніх шарах сітківки (відростки та тіла клітин Мюллера), а на 28-му добу – у складі фіброзних проліфератів сітківки. Застосування інсуліну та карбацетаму зменшувало експресію GFAP. Тканинна експресія проапоптотичного протеїну каспази-3 відповідала такій для GFAP, дія інсуліну і карбацетаму її знижувала.

Відомо, що GFAP є маркером реактивного гліозу в сітківці [17]. У нормі він експресується переважно астроцитами, тоді як у клітинах Мюллера його активність значно нижча. При ЦД останні проявляють аберантну надекспресію GFAP [20]. Це відповідало нашим результатам – на 7-й день експресія GFAP виявлялася у астроцитах шару нервових волокон, тоді як пізніше долучалися клітини Мюллера, відростки яких радіально пересікали внутрішні шари сітківки.

Гіперглікемія призводить до першочергової реакції мікроглії, яка активується при накопиченні продуктів вуглеводного метаболізму з утворенням прооксидантів, активації індукцибельної синтази оксиду азоту (iNOS), ядерного транскрипційного

фактора NF- κ B та інших ростових факторів [21]. Пізніше прозапальні цитокіни, а також TGF- β і VEGF індукують реактивний гліоз та гліально-мезенхімальний перехід клітин Мюллера у міофібробласти з розвитком фіброзу сітківки [19]. Гліоз клітин Мюллера є відмінною рисою ДР, маркером чого є надекспресія GFAP, прозапальних цитокінів, хемокінів і VEGF, залучення лейкоцитів та запуск хронічного запалення і ангиогенезу [22]. При ЦД клітини Мюллера мають низку аномальних функцій, вони стають гліозними, погіршують депонування калію, поглинання глутамату та ГАМК, експресують модулятори ангиогенезу [23].

Отже, глії вже на початкових етапах розвитку ДР належить ключова патогенетична роль у формуванні основних патологічних процесів – ангиогенезу та фіброзу сітківки. Крім того, розвиток специфічної діабетичної нейродегенерації сітківки також є наслідком її надмірної активації [24]. При цьому дегенеративні зміни нейронів внутрішніх шарів сітківки передують клінічним проявам ДР. Більше того, реактивний гліоз, втрата функцій й апоптоз нейронів виникають задовго до

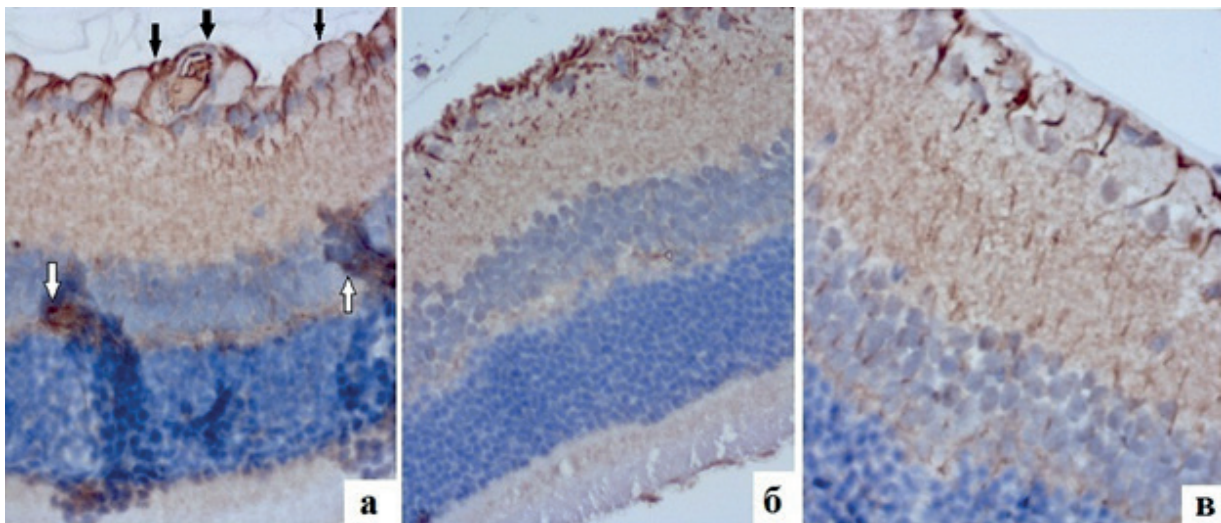


Рис. 4. Мікропрепарати сітківки щура. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження каспази-3, дозabarвлення гематоксиліном; а – контрольна група, б – введення інсуліну, в – введення інсуліну і карбацетаму; збільшення у 400 разів. Примітки: на а чорні стрілки – мікроаневризми сітківки з вогнищами ангиогенезу, імунопозитивне забарвлення ендотелію; білі стрілки – імунопозитивні клітини у складі фіброзних проліфератів

мікроангіопатії [6]. Натомість у нашому дослідженні чітко показано, що вони з'являються практично одночасно вже на ранніх етапах ДР. Аналіз літературних даних доводить, що причиною їх розвитку є універсальний механізм активації патологічних клітинних каскадів з утворення надмірної кількості прозапальних медіаторів і факторів росту, що запускає хронічне проліферативне запалення.

Відомо, що при ДР всі нервові клітини сітківки (гангліозні, біполярні, амакринові та фоторецепторні) демонструють погіршення функції, а клітини Мюллера надекспресують GFAP та мігрують у преретинальні мембрани [25, 26]. *In vitro* було показано, що зміни активності нейронів сітківки пов'язані з порушенням гальмівних процесів через пригнічення вивільнення ГАМК, збільшення вивільнення глутамату та посилення збудження гангліозних клітин [27].

Гіперглікемія на ранніх стадіях спостерігається дисфункція нейросітківки незалежно від розвитку класичної мікросудинної ДР [28]. У нормі амакринові клітини типу A17 забезпечують інгібування ГАМК-ергічного зворотного впливу на біполярні клітини. У разі ЦД змінюються синаптичні рецептори на клітинах A17 зі зниженням їх кальцієвої проникності. Оскільки останні опосередковують синаптичне вивільнення ГАМК, зменшена проникність кальцію цих рецепторів при ЦД призводить до дефіциту ГАМК з наступним розгальмуванням і збільшенням вивільнення глутамату з біполярних клітин [28]. Отже, відновлення ГАМК-ергічної медіації є можливим напрямком патогенетичної корекції нейрональної дисфункції сітківки при ДР.

Показано, що бензодіазепіновий анестетик мідазолам запобігав індукованому гіперглікемією мікросудинному витоку в сітківці мишей з ЦД через пригнічення клітинної дії VEGF, утворення активних форм кисню і активації трансглутамінази в ендотеліальних клітинах сітківки людини [29]. Ці ефекти скасувалися антагоністом рецепторів ГАМК типу A (GABA_A) флумазенилом. Також бер-

берин, який має властивості агоніста ГАМК A-рецепторів у щурів з ЦД збільшував виживаність гангліонарних клітин, зменшував їх апоптоз та значно покращував зорову функцію через шлях рецептора ГАМК-α-протеїнкінази C-α (GABAAR/PKC-α) [30].

Першим препаратом, який отримав схвалення Управління з контролю якості харчових продуктів та лікарських засобів США (FDA) для лікування діабетичної невропатії став агоніст ГАМК-рецепторів прегабалін [31]. У щурів з ЦД він покращував гістопатологічні аномалії сітківки, пригнічував надекспресію інтерлейкіну-1β, фактора некрозу пухлин α, поверхневого маркера мікроглії CD11b, послаблював експресію каспази-3 і фрагментацію ДНК, а також знижував вміст глутамату, оксиду азоту та малонового діальдегіду при підвищенні вмісту відновленого глутатіону. Отже, за умов ЦД прегабалін полегшував нейрозапалення сітківки, апоптоз і окисний стрес через посилення ГАМК-ергічної регуляції [31].

Таким чином, вплив на ГАМК-ергічні процеси є обґрунтованим напрямком патогенетичного лікування нейрональної дисфункції сітківки при ДР. Перспективним препаратом є карбацетам, який має низку позитивних ефектів при різних патологічних процесах [14, 15, 32] і, у тому числі, при ЦД [16]. Основною його дією є модулююча, котра запобігає надмірній активації регуляторних систем при дії патогенних факторів. Такий вплив загалом характерний для бензодіазепінів, які, наприклад, при хворобі Альцгеймера покращують клінічні результати внаслідок алостеричної модуляції ГАМК [32]. У нашому дослідженні показаний превентивний ефект препарату відносно розвитку ранніх проявів ДР (реактивного гліозу, ангіогенезу, фіброзних проліфератів), а також зниження експресії GFAP та каспази-3.

ВИСНОВКИ

1. Реакція глії сітківки при розвитку ДР за результатами імуногістохімічного виявлен-

ня GFAP характеризувалася поступовою активацією із першочерговим залученням астроцитів внутрішніх шарів сітківки, потім – клітин Мюллера (реактивний гліоз). Вміст GFAP у тканинах сітківки за результатами імуноблотингу суттєво зростає.

2. GFAP-позитивні клітини тісно контактували з вогнищами патологічного ангиогенезу внутрішніх шарів сітківки, а також брали участь в утворенні фіброзних проліфератів у зовнішніх.

3. Модулятор ГАМК-бензодіазепінового рецепторного комплексу карбацетам знижував експресію GFAP та каспази-3 у сітківці та попереджував розвиток реактивного гліозу, ангиогенезу та утворення фіброзних проліфератів.

SV Ziablitzev¹, DB Zhupan¹, OO Dyadyk²

THE INFLUENCE OF A BENZODIAZEPINE RECEPTOR AGONIST ON THE STATE OF GLIA IN THE DIABETIC RETINOPATHY

¹*Bogomolets National Medical University, Kyiv;*

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

Diabetic retinopathy is a progressive tissue-specific neurovascular complication of diabetes with a multifactorial pathogenesis, in which microvascular disorders are preceded by damage to nerve elements. The latter begin with the early involvement of glia, including astrocytes and Müller cells. Taking into account the establishment of GABA-ergic deficiency, the use of modulators of the GABA-benzodiazepine receptor complex, for example, Carbacetam, which has shown satisfactory neuroprotective properties, seems promising. Diabetes mellitus was modeled by a single administration of streptozotocin (50 mg/kg; “Sigma-Aldrich”, China) to three-month-old male Wistar rats. Already after 7 days, according to immunohistochemical detection of glial fibrillary acidic protein (GFAP), reactive gliosis of astrocytes of the inner retina layers was detected, to which Müller cells joined from the 14th day. The content of GFAP in retinal tissues increased significantly. GFAP-positive cells were in close contact with foci of pathological angiogenesis in the inner layers of the retina and also took part in the formation of fibrous proliferates in the outer layers. Detection of caspase-3 showed the activation of apoptosis in astrocytes and radial processes of Müller cells in the inner plexiform layer. Carbacetam in combination with insulin reduced the expression of GFAP and caspase-3 in the retina and prevented the development of reactive gliosis, angiogenesis, and the formation of fibrous proliferates, which

makes it a candidate for further studies in the treatment of diabetic retinopathy.

Keywords: carbacetam; immunohistochemistry; immunoblotting; glial fibrillary acidic protein (GFAP); reactive gliosis; caspase-3; streptozotocin.

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.

REFERENCES

1. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, Stein C, Basit A, Chan JCN, Mbanya JC, Pavkov ME, Ramachandran A, Wild SH, James S, Herman WH, Zhang P, Bommer C, Kuo S, Boyko EJ, Magliano DJ. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabet Res Clin Pract.* 2022 Jan;183:109119.
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. Wang W, Lo ACY. Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and treatments. *Int J Mol Sci.* 2018 Jun 20;19(6):1816.
4. Sinclair SH, Schwartz SS. Diabetic retinopathy-an underdiagnosed and undertreated inflammatory, neurovascular complication of diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019 Dec 13;10:843.
5. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005 Jun;54(6):1615-25.
6. Simó R, Stitt AW, Gardner TW. Neurodegeneration in diabetic retinopathy: does it really matter? *Diabetologia.* 2018 Sep;61(9):1902-12.
7. Grigsby JG, Cardona SM, Pouw CE, Muniz A, Mendiola AS, Tsini AT, Allen DM, Cardona AE. The role of microglia in diabetic retinopathy. *J Ophthalmol.* 2014;2014:705783.
8. Sundstrom JM, Hernández C, Weber SR, Zhao Y, Dunkelbarger 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.
9. 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.
10. RübSAM A, Parikh S, Fort PE. Role of inflammation in dia-

- betic retinopathy. *Int J Mol Sci.* 2018 Mar 22;19(4):942.
11. Eggers ED. Visual dysfunction in diabetes. *Annu Rev Vis Sci.* 2023 May 10.
 12. Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Saad HM, Batiha GE. Benzodiazepines in Alzheimer's disease: beneficial or detrimental effects. *Inflammopharmacology.* 2023 Feb;31(1):221-30.
 13. Wan H, Warburton EC, Zhu XO, Koder TJ, Park Y, Aggleton JP, Cho K, Bashir ZI, Brown MW. Benzodiazepine impairment of perirhinal cortical plasticity and recognition memory. *Eur J Neurosci.* 2004 Oct;20(8):2214-24.
 14. Ziablitsev SV, Starodubskaya OO, Bogza SL. Influence of carbacetam on neurologic destruction processes under the experimental traumatic brain injury. *J Educat Health Sport Form Health Sci.* 2017;7(2):601-11.
 15. Kmet OG, Ziablitsev SV, Filipets ND, Kmet TI, Slobodian XV. Carbacetam effect on behavioral reactions in experimental Alzheimer's disease. *Arch Balkan Med Union.* 2019 Mar; 54(1):124-9.
 16. Kmet OG, Ziablitsev SV, Filipets ND. Peculiarities of the antioxidant protection and nitrogen oxide systems of the brain in rats with experimental type 2 diabetes mellitus after carbacetam administration. *Int J Endocrinol.* 2019;15(5):376-80.
 17. Lelyte I, Ahmed Z, Kaja S, Kalesnykas G. Structure-function relationships in the rodent streptozotocin-induced model for diabetic retinopathy: A systematic review. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2022 May;38(4):271-86.
 18. Proia AD, Caldwell MC. Intraretinal neovascularization in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 2010 Jan;128(1):142-4.
 19. Wu D, Kanda A, Liu Y, Noda K, Murata M, Ishida S. Involvement of Müller glial autoinduction of TGF- β in diabetic fibrovascular proliferation via glial-mesenchymal transition. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2020 Dec 1;61(14):29.
 20. Cheung AK, Fung MK, Lo AC, Lam TT, So KF, Chung SS, Chung SK. Aldose reductase deficiency prevents diabetes-induced blood-retinal barrier breakdown, apoptosis, and glial reactivation in the retina of db/db mice. *Diabetes.* 2005 Nov;54(11):3119-25.
 21. Fresta CG, Fidilio A, Caruso G, Caraci F, Giblin FJ, Leggio GM, Salomone S, Drago F, Bucolo C. A New human blood-retinal barrier model based on endothelial cells, pericytes, and astrocytes. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 27;21(5):1636.
 22. Vujosevic S, Micera A, Bini S, Berton M, Esposito G, Midena E. Aqueous humor biomarkers of Müller cell activation in diabetic eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015 Jun;56(6):3913-8.
 23. Fletcher EL, Phipps JA, Ward MM, Puthussery T, Wilkinson-Berka JL. Neuronal and glial cell abnormality as predictors of progression of diabetic retinopathy. *Curr Pharm Des.* 2007;13(26):2699-712.
 24. Lynch SK, Abramoff MD. Diabetic retinopathy is a neurodegenerative disorder. *Vis Res.* 2017 Oct;139:101-7.
 25. Meshi A, Chen KC, You QS, Dans K, Lin T, Bartsch DU, Cheng L, Amador-Patarroyo MJ, Muftuoglu IK, Gomez ML, Nudleman E, Freeman WR. Anatomical and functional testing in diabetic patients without retinopathy: Results of optical coherence tomography angiography and visual acuity under varying contrast and luminance conditions. *Retina.* 2019 Oct;39(10):2022-31.
 26. Pitale PM, Gorbatyuk MS. Diabetic retinopathy: From animal models to cellular signaling. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 27;23(3):1487.
 27. Eggers ED, Carreon TA. The effects of early diabetes on inner retinal neurons. *Vis Neurosci.* 2020 Sep 16;37:E006.
 28. Castillo Á, Ambrósio AF, Hartveit E, Veruki ML. Disruption of a neural microcircuit in the rod pathway of the mammalian retina by diabetes mellitus. *J Neurosci.* 2015 Apr 1;35(13):5422-33.
 29. Lee YJ, Kim M, Lee JY, Jung SH, Jeon HY, Lee SA, Kang S, Han ET, Park WS, Hong SH, Kim YM, Ha KS. The benzodiazepine anesthetic midazolam prevents hyperglycemia-induced microvascular leakage in the retinas of diabetic mice. *FASEB J.* 2018 May 21;32:fj201800014RR.
 30. Fang W, Huang X, Wu K, Zong Y, Yu J, Xu H, Shi J, Wei J, Zhou X, Jiang C. Activation of the GABA- α receptor by berberine rescues retinal ganglion cells to attenuate experimental diabetic retinopathy. *Front Mol Neurosci.* 2022 Aug 9;15:930599.
 31. Ali SA, Zaitone SA, Dessouki AA, Ali AA. Pregabalin affords retinal neuroprotection in diabetic rats: Suppression of retinal glutamate, microglia cell expression and apoptotic cell death. *Exp Eye Res.* 2019 Jul;184:78-90.
 32. Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Saad HM, Batiha GE. Benzodiazepines in Alzheimer's disease: beneficial or detrimental effects. *Inflammopharmacology.* 2023 Feb;31(1):221-30.

*Матеріал надійшов
до редакції 12.07.2023*