

Ранні механізми розвитку мікроангіопатії та вплив блокади клітинних протеїнказ при експериментальній діабетичній ретинопатії

К.О. Усенко, С.О. Риков, В.В. Ліходієвський, С.В. Зябліцев

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ; e-mail: zsv1965@gmail.com

Серед молекулярних механізмів розвитку діабетичної мікроангіопатії ключове значення має активація глії, що супроводжується утворенням специфічних маркерів: протеїну S100, гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP), а також васкулоендотеліального фактора росту (VEGF). Метою дослідження було встановлення ранніх механізмів розвитку діабетичної мікроангіопатії та вплив на неї блокади клітинних протеїнказ. У щурів-самців лінії Вістар моделювали діабетичну ретинопатію одноразовим введенням стрептозоцину (50 мг/кг; "Sigma-Aldrich", Кумаї). Щурів було розподілено на 3 групи: контрольна, з введенням інсуліну (30 Од; "NovoNordiskA/S", Данія) і з введенням інсуліну і сорафенібу (55 мг/кг; "Cipla", Індія). Проводили імуногістохімічне (для всіх маркерів) та імуноблотингове (для GFAP) дослідження. Вивчали ультратонкі зрізи сітківки на мікроскопі ПЕМ 125к ("SELM1", Україна). Встановлено збільшення експресії всіх маркерів у відростках клітин Мюллера та астроцитах, які формували муфтоподібні сплетення навколо мікроаневризм та новоутворених капілярів. Спостерігалася послідовність активації маркерів – першою збільшувалась експресія протеїну S100 (астроцитарна реакція), потім – GFAP (залучення клітин Мюллера та реактивний гліоз), у пізньому періоді – VEGF, що зумовлювало активацію патологічного ангіогенезу. Встановлено гальмування розвитку мікроангіопатії при блокаді клітинних протеїнказ сорафенібом, що було пов'язано з пригніченням експресії досліджених маркерів.
Ключові слова: діабетична ретинопатія; мікроангіопатія; реактивний гліоз; S100; GFAP; VEGF; сорафеніб.

ВСТУП

Одним із найпоширеніших мікросудинних ускладнень хронічної гіперглікемії при цукровому діабеті (ЦД) є діабетична ретинопатія (ДР), яка вражає майже третину пацієнтів з ЦД і є однією з основних причин сліпоти серед дорослого працездатного населення [1, 2]. Визначення стадій ДР засновано на клінічно видимих мікросудинних змінах сітківки [3]. Відповідно, ДР поділяють на непроліферативну (НПДР) і проліферативну (ПДР), які включають шість стадій: 1) НПДР, стадія I: мікроангіоми та невеликі точки кровотечі; стадія II: тверді ексудати та стадія III: ватноподібні м'які ексудати; 2) ПДР, стадія IV: неоваскуляризація, крововилив у склоподібне тіло; стадія V: фіброваскулярна

проліферація, організація склоподібного тіла і стадія VI: відшарування сітківки з подальшою сліпотою. Існує також поділ ступеня прогресування ДР на три фенотипи, що відображають міжіндивідуальні відмінності: фенотип А характеризується низьким оборотом мікроаневризм (ОМА, менше ніж 6), фенотип В – низьким ОМА (менше ніж 6) та збільшеною центральною товщиною сітківки, фенотип С – високим ОМА (більше ніж 6) [4]. Ці висновки підкреслюють важливість виникнення, подальшій трансформації та візуалізації мікросудинних змін сітківки для прогресування ДР.

Механізмами початкової стадії ДР є збільшення проникності судин сітківки, утворення мікроаневризм, ексудація, крововиливи та ішемія сітківки, що спричиняє

нейросенсорну атрофію і зумовлює погіршення зору [5]. Пізні стадії характеризується прогресією гіпоксії і важкою ішемією сітківки, інфарктами шару нервових волокон, неоваскулярною проліферацією, звивистістю склоподібного тіла та крововиливами, що призводить до серйозного погіршення зору в результаті значних крововиливів у склоподібне тіло, а у важких випадках – до тракційного відшарування сітківки [3, 5].

Серед молекулярних механізмів на початкових стадіях ДР ключове значення має активація глії (реактивний гліоз), що відбувається безпосередньо у відповідь на накопичення продуктів аномального глюкозного метаболізму з утворенням специфічних маркерів: протеїну S100 та гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP), а також васкулоендотеліального фактора росту (VEGF) [4, 6]. Джерелами цих факторів є активовані клітини Мюллера та астроцити, що в нормі знаходяться у стані спокою та підтримують місцеві нейрональні функції, але значно активуються вже на початковій стадії ДР [7]. Реактивний гліоз супроводжується значно підвищеною експресією VEGF і прозапальних цитокінів, що є причиною посилення витоку мікросудин сітківки і їх проліферацією в ішемізованих ділянках [8].

Збільшення експресії VEGF та інших факторів зумовлено активацією сигнальних внутрішньоклітинних кіназ Ras/Raf-1/MEK/ERK [9]. Надекспресія білка, що інгібує кіназу Raf-1, запобігає виникненню діабетичної нейродегенерації сітківки через пригнічення шляху p38-MAPK [10]. Інгібування MAPK3 та шляхів p38 і NF-κB пригнічує проліферацію ендотеліальних клітин капілярів сітківки [11].

Показано, що в культурі первинних астроцитів головки зорового нерва людини сорафеніб значно зменшував спричинену світлом гіперекспресію VEGF та інших факторів росту, що вказувало на його потенціал як лікувального засобу неоваскуляризації сітківки [12]. Таким чином, інгібування клі-

тинних протеїнкіназ може бути потужним заходом гальмування розвитку діабетичної мікроангіопатії вже на ранніх етапах її розвитку.

Метою нашого дослідження було встановлення ранніх механізмів розвитку діабетичної мікроангіопатії та вплив на неї блокади клітинних протеїнкіназ.

МЕТОДИКА

При виконанні роботи керувалися нормами та принципами Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986), Директиви Ради Європи 86/609/EEC (1986), Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (2001) та експертним висновком Комісії з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень при Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця (протокол № 165 від 05.12.2024 р.).

Дослідження проведено на 55 тримісячних щурах-самцях лінії Вістар масою 140–160 г. Експериментальний ЦД моделювали одноразовим внутрішньоочеревинним введенням 45 щурам стрептозотоцину (50 мг/кг; “Sigma-Aldrich”, Китай), розчиненого у холодному 0,1 М цитратному буфері (pH4,5). 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 (ACCU-Chek Instant, “Roche”, Німеччина) у крові, забраної з хвостової вени натще. Контрольним щурам (n = 5) замість стрептозотоцину вводили тільки цитратний буфер. Через 3 доби після ін’єкції вміст глюкози у крові тварин, яким вводили стрептозоточин був не менше ніж 15 ммоль/л, у жодного щура, яким було введено тільки

цитратний буфер, вміст глюкози у крові не перевищував 6,1 ммоль/л. За тваринами спостерігали протягом 3 міс. Для отримання початкових результатів використано 5 інтактних щурів.

Через 7 діб тварин зі стійкою гіперглікемією ($n = 45$) сліпим рандомним способом розділили на 3 групи по 15 особин. Тваринам 1-ї групи (контроль) лікування гіперглікемії не проводили. Щурам 2-ї групи через день внутрішньоочеревинно вводили інсулін короткої дії (Actrapid HM Penfill, Novo “Nordisk A/S”, Данія) у дозі 30 Од, тваринам 3-ї групи крім інсуліну за схемою 2-ї групи *per os* щоденно вводили розчин інгібітора протеїніназ сорафенібу (200 мг, “Cipla”, Індія) у дозі 50 мг/кг у вигляді соше.

Тварин виводили з експерименту через 7 і 28 діб та через 3 міс у кількості по 5 особин у кожній групі за допомогою смертельної ін’єкції тіопенталу (75 мг/кг). 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. Імуногістохімічне дослідження виконано з використанням моноклональних мишиних антитіл проти протеїну S100, GFAP (“ThermoFisher Scientific”, США) і VEGF (“Invitrogen”, США). Зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном. Мікроскопічне дослідження та фотоархівування здійснювали із 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 тріс-HCl-буфері (pH 7,4) з додаванням інгібіторів фосфатаз і протеаз (Pierce Protease and Phosphatase inhibitor, “ThermoScientific”, США, #A32961). Електрофорез проводили у 8%-му поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS-PAGE) у камері

для вертикального гелі-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 (β -actin; loading control, no. MA5-15739, mouse, 1:3,000, “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 (goat anti-rabbit or anti-mouse IgG, “Invitrogen”, США, cat. nos. G-21234 and 31430, respectively, 1:8,000 diluted). Напівкількісний аналіз проводили денситометрично, використовуючи програмне забезпечення TotalLab (TL120, “Nonlinear Inc”, США). Результати імуноблот-аналізу вмісту виражали в умовних одиницях від контрольного значення оптичної густини відповідної поліпептидної зони на блотограмах, нормованої за вмістом актину в кожному зразку.

Для електронно-мікроскопічного дослідження матеріал фіксували в розчині глютаральдегіду із дофіксацією в розчині чотирикислого осмію, зневоднювали, заливали у епон-аралдит. Ультратонкі зрізи контрастували ураніацетатом та цитратом свинцю. Досліджували при різних збільшеннях на електронному мікроскопі ПЕМ 125к (“SELMi”, Україна).

Для статистичного аналізу застосовували програмне забезпечення Statistica 10 (StatSoft, Inc., США). Описову статистику проводили з розрахунком середніх та їхніх стандартних похибок. Вибіркові середні порівнювали із застосуванням дисперсійного аналізу (ANOVA), вірогідними вважали значення $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ

Вже на 7-му добу після моделювання ЦД сітківка тварин мала досить виражені мор-

фологічні зміни (рис. 1). Ранні прояви ДР включали зниження щільності нервових клітин у ядерних шарах сітківки, набряк усіх шарів, що особливо було помітно у внутрішньому плексиформному шарі та шарі нервових волокон, дилатацію судин, ділянки ішемії. У шарі гангліонарних клітин відмічено гіпохромні нейрони з вираженою вакуолізацією, що чергувалися з гіперхромними нейронами; щільність гангліонарних нейронів знижувалася. Вздовж внутрішньої поверхні сітківки відмічено розширені капіляри, як правило, заповнені кров'ю, подекуди з мікротромбами. Такі зміни свідчили про розвиток нейродегенерації, яка формувалася на тлі порушень метаболізму та мікроциркуляції. У шарі нервових волокон збільшувалась інтенсивність забарвлення на протеїн S100, GFAP і VEGF. S100-позитивні волокна та окремі поодинокі клітини у шарі нервових волокон за морфологією і місцем розташування відповідали астроцитам, які першими активуються у відповідь на накопичення продуктів аномального метаболізму у сітківці при гіперглікемії [8]. Маркер макроглії GFAP також виявлявся у межах шару нервових волокон. Імовірно, позитивно забарвлювалися відростки клітин Мюллера, які в нормі не утворювали GFAP, але, як було показано у попередніх дослідженнях, за умов ЦД експресія цього маркера збільшувалася [13]. VEGF-позитивне забарвлення також виявлялося у шарі нервових волокон та

відповідало розподілу сплетень макроглії у цьому шарі, що також відповідало попередньо отриманим даним [14].

Таким чином, була встановлена рання активація експресії маркерів, що мали відношення до діабетичного ангиогенезу. Певною мірою це могло створити умови патологічного ангиогенезу у сітківці вже на ранніх термінах розвитку ДР.

Через 28 діб відмічено прогресування виявлених змін (рис. 2). Спостерігалися набряк та розрідження ядерних шарів сітківки, що особливо було виражене у зовнішньому плексиформному шарі. У внутрішньому плексиформному шарі прогресував набряк, розширювалися ділянки ішемії. Вздовж внутрішньої поверхні сітківки спостерігалися численні мікроаневризми, що відповідало клінічним спостереженням утворення інтравитреальних судинних аномалій сітківки, які є відомими ознаками непроліферативної ДР [3]. У внутрішньому ядерному шарі добре візуалізувалися тіла S100-позитивних клітин, що за морфологією відповідали клітинам Мюллера, також інтенсивно забарвлювалися переплетення волокон макроглії та окремі S100-позитивні клітини (астроцити) у шарах нервових волокон та гангліонарних клітин. GFAP-позитивне забарвлення виявлялося у радіальних волокнах клітин Мюллера та у вигляді облямівки по внутрішній поверхні сітківки, де позитивно забарвлені волокна макроглії

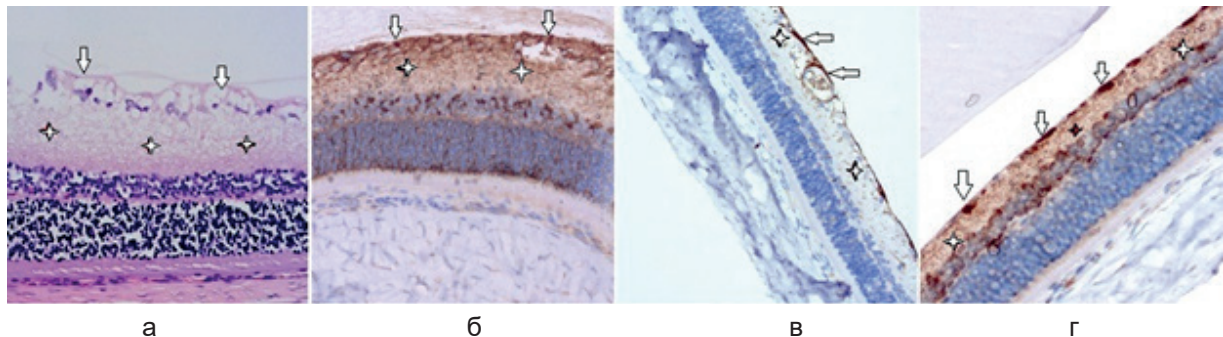


Рис. 1. Мікропрепарати сітківки щура на 7-му добу після моделювання цукрового діабету; забарвлення гематоксином і еозином (а); репрезентативні результати імуногістохімічного забарвлення на протеїн S100 (б), GFAP (в) і VEGF (г); $\times 200$; на всіх мікрофото білі стрілки – шар нервових волокон, білі зірочки – внутрішній плексиформний шар

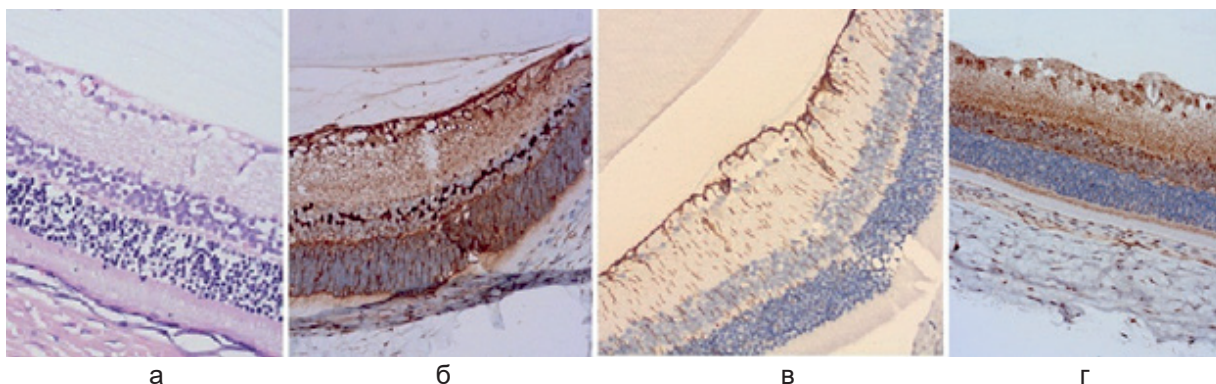


Рис. 2. Мікропрепарати сітківки щура на 28-му добу після моделювання цукрового діабету; забарвлення гематоксиліном і созином (а); репрезентативні результати імуногістохімічного забарвлення на протеїн S100 (б), GFAP (в) і VEGF (г); $\times 200$

утворювали сплетення навколо численних мікроаневризмів. Активація макроглії, котру виявлено у нашому дослідженні, відповідала поняттю реактивного гліозу [7, 8]. Порівняно з попереднім терміном наростала інтенсивність забарвлення VEGF у шарі нервових волокон, а також і у інших шарах сітківки, особливо у клітинах по периферії внутрішнього ядерного шарів (див. рис. 2).

Через 3 міс серед інших проявів розвитку ДР спостерігалися сформовані ознаки діабетичної мікроангіопатії сітківки (рис. 3). Вддовж внутрішньої поверхні сітківки спостерігалися щільно розташовані мікросудини, які мали суттєво розширений просвіт, часто з мікротромбами. Подекуди відмічено судини з декількома просвітами,

огорнуті єдиною щільною мембраною, що свідчило про утворення нових судин – патологічний ангиогенез. З мікросудинами щільно контактували позитивно забарвлені відростки макроглії, які утворювали муфти навколо них. До складу останніх входили інтенсивно забарвлені S100-, GFAP- та VEGF-позитивні волокна. Якщо на ранніх термінах за інтенсивністю переважали S100-позитивні елементи, то на пізніх – VEGF-позитивні. Тобто можна було говорити про певну послідовність активації маркерів – першим було збільшення експресії протеїну S100 (астроцитарна реакція), потім – GFAP (залучення клітин Мюллера та реактивний гліоз) і у пізньому періоді – VEGF, що зумовлювало виражену активацію патологічного ангиогенезу сітківки.

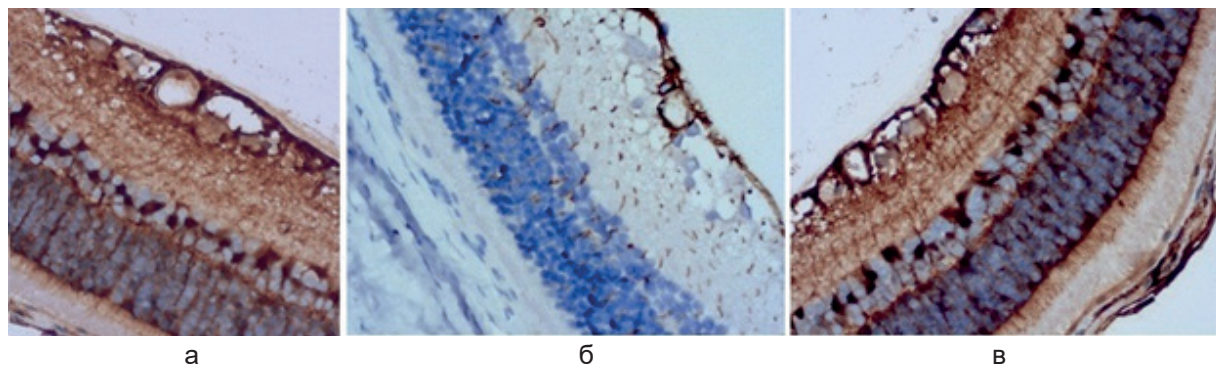
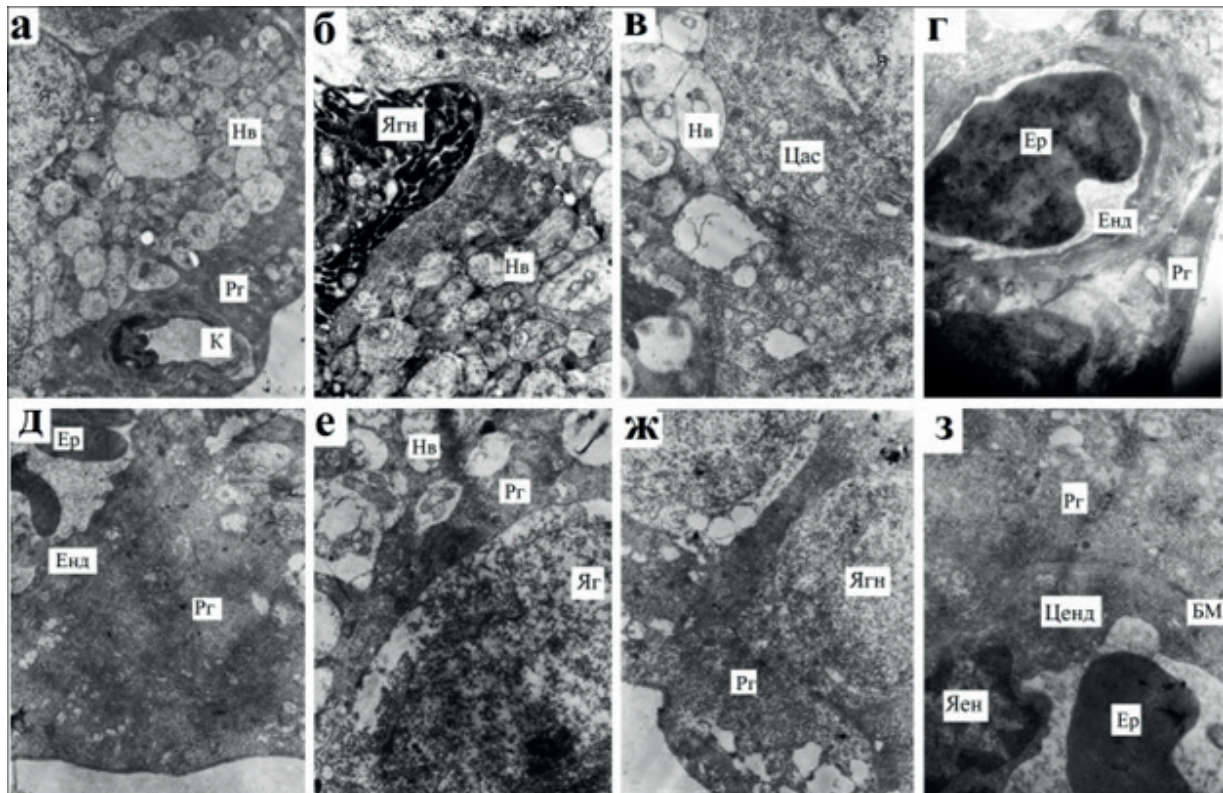


Рис. 3. Мікропрепарати сітківки щура через 3 міс після моделювання цукрового діабету; репрезентативні результати імуногістохімічного забарвлення на протеїн S100 (а), GFAP (б) і VEGF (в); $\times 400$

У тварин з ДР через 28 днів у шарі нервових волокон виявлено ознаки набряку. Внутрішня обмежувальна мембрана потовщена внаслідок збільшення товщини відростків радіальних гліоцитів (див. рис. 4). Радіальні гліоцити, що формували внутрішню обмежувальну мембрану мали значно потовщені відростки із клиноподібним розширенням на кінці, які містили вакуолізовані мітохондрії. Безпосередньо під внутрішньою обмежувальною мембраною кровоносні капіляри були з потовщеною стінкою через набряк ендотелію і базальної мембрани. Мемб-



31

рана ендотеліоцита мала хвилястий контур і формувала випинання в просвіт капіляра. Радіальні гліоцити демонстрували тісний контакт із капілярами. Такі зміни узгоджувалися з наведеними у літературі та вказували на формування стану гідропічної дистрофії [15].

Таким чином, за умов моделювання ЦД морфологічні ультраструктурні зміни у шарі нервових волокон полягали у потовщенні внутрішньої обмежувальної мембрани за рахунок відростків радіальних гліоцитів у її складі. Також виявлені реактивні зміни у вигляді потовщення, хвилястості стінки гемокapілярів мікроциркуляторного русла. Це може трактуватися як прояв мікроангіопатії, що одночасно супроводжується реактивним гліозом.

При застосуванні інгібітора клітинних протеїнкіназ сорафенібу активність морфологічних проявів ДР була значно меншою (рис. 5). На препаратах сітківки зберігалася висока щільність клітин ядерних шарів, менше визначався набряк плексиформних шарів, майже не фіксувалось ознак мікроангіопатії. Всі досліджені маркери мали незначну інтенсивність специфічного забарвлення. У внутрішніх шарах сітківки протеїн S100 був локалізований тільки по ходу нервових волокон вздовж внутрішньої поверхні сітківки. GFAP забарвлювався у клітинах Мюллера, але із суттєво меншою інтенсивністю, ніж у контролі. Слабке забарвлення, переважно дифузного типу, було

притаманне VEGF. Отже, було встановлено пригнічення реактивного гліозу та експресії протеїну S100, GFAP і VEGF під впливом лікування.

За результатами імуноблотингового дослідження, що було проведено через 3 міс, вміст GFAP у тканинах сітківки був збільшеним у 2,22–4,94 раза порівняно з інтактними тваринами у всіх групах ($P < 0,05$), з максимальними значеннями у контролі, де лікування не проводили (рис. 6). Відзначено збільшення вмісту не тільки мономерної форми GFAP (49 кДа), але й продуктів його обмеженого протеолізу (37 кДа), що було ознаками реактивного астрогліозу [16].

У групі тварин із застосуванням інсуліну вміст GFAP був суттєво меншим. Це вказувало на зниження його експресії, що була індукована гіперглікемією. При використанні інсуліну і сорафенібу він був найменшим, що свідчили про гальмування надекспресії цього маркера і, відповідно, про пригнічення реактивного гліозу.

ОБГОВОРЕННЯ

Вже ранні прояви ДР при застосованій стрептозотоциновій моделі гіперглікемії включали нейродегенерацію гангліонарних нейронів, ділянки набряку та ішемії, порушення метаболізму та мікроциркуляції [17]. У цьому дослідженні ми зосередилися на пошуку ранніх механізмів мікроангіопатії. Була з'ясована динаміка її розвитку та роль

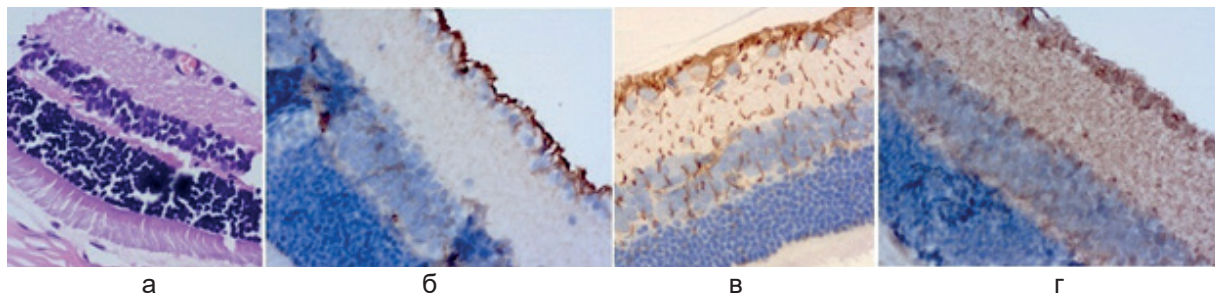


Рис. 5. Мікропрепарати сітківки щура через 3 міс після моделювання цукрового діабету та лікування інсуліном і сорафенібом; забарвлення гематоксиліном і еозином (а); репрезентативні результати імуногістохімічного забарвлення на протеїн S100 (б), GFAP (в) і VEGF (г); $\times 400$

реактивного гліюзу у виникненні мікроаневризм на внутрішній поверхні сітківки. Встановлено послідовне збільшення експресії протеїну S100, GFAP і VEGF у відростках клітин Мюллера та астроцитах, які формували муфтоподібні сплетення навколо новоутворених капілярів.

Слід зазначити, що і у нормі гемокапіляри, що знаходилися безпосередньо під внутрішньою обмежувальною мембраною, тісно контактували з немієлінізованими нервовими волокнами та тілами світлих і темних гангліонарних нейронів [15]. За

нашими результатами при ДР кровоносні капіляри мали потовщену стінку внаслідок збільшення товщини ендотелію і базальної мембрани. З капілярами тісно контактували радіальні гліоцити, утворюючи клиноподібні розширення.

З класичних позицій ДР є комплексом прогресуючих змін у мікроциркуляторному руслі, які супроводжуються ішемією, неоваскуляризацією, зміною проникності судин і набряком [5, 18, 19]. Первинною реакцією внутрішньої мікроциркуляторної мережі сітківки при гіперглікемії та метаболічно-

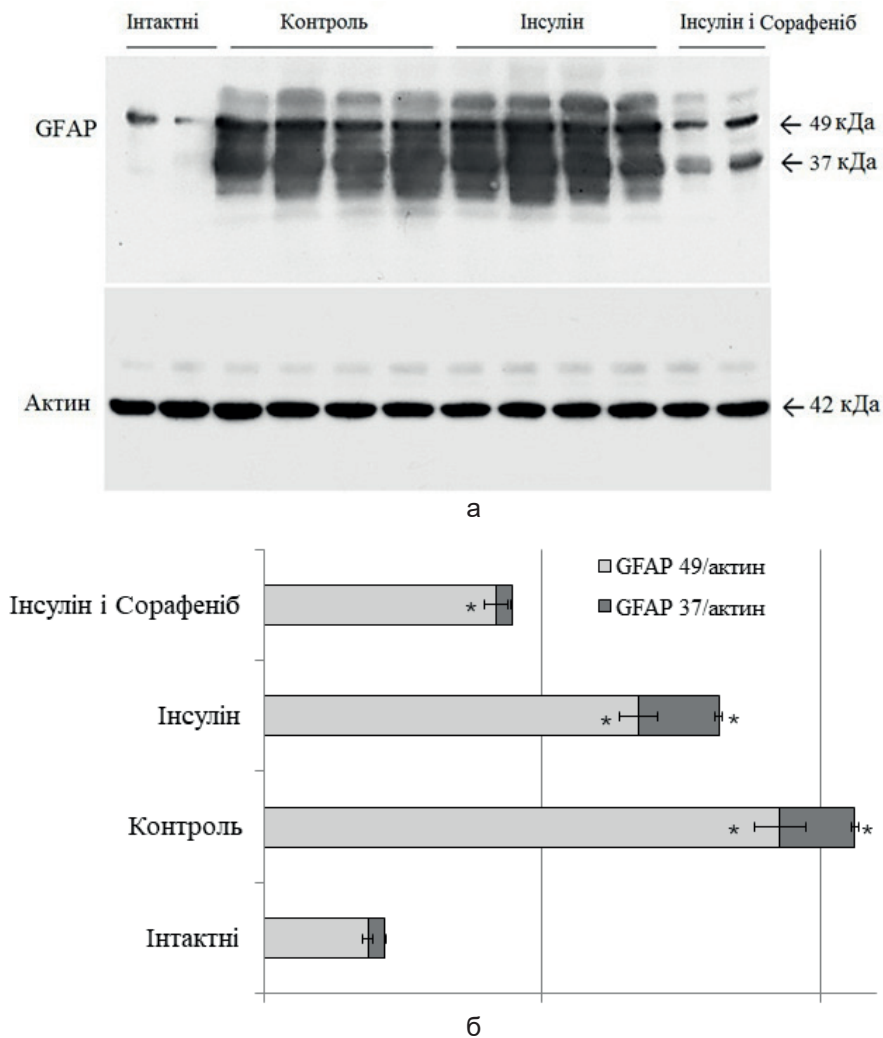


Рис. 6. Вміст GFAP у тканині сітківки інтактних тварин та у дослідних групах через 3 міс; а – репрезентативні блотограми GFAP і актину; б – результати денситометричного аналізу блотограм (співвідношення GFAP 49 кДа і GFAP 37 кДа до актину); *P < 0,05 порівняно з інтактними тваринами

му стресі є вазодилатація, яка опосередковується гліальними ауторегуляторними сигналами. Надалі спостерігається прогресування судинної дисфункції (ушкодження ендотеліальних клітин, загибель перицитів і потовщення капілярної базальної мембрани сітківки) [20]. Ключовими моментами є деградація нейроваскулярної одиниці сітківки та порушення цілісності гематоретинального бар'єра [21].

Найбільшою реактивністю відрізняється мікроглія, яка продукує прозапальні цитокіни, фактори росту, матриксні металопротеїнази та ініціює запалення та апоптоз гангліонарних нейронів [8, 18, 19]. Встановлено, що протеїни S100 підвищують інфільтрацію мікроглії та макрофагів у мишачій моделі проліферативної ДР, а у крові пацієнтів із ЦД концентрація протеїнів S100A8 та S100A9 збільшувалася, що корелювало з тяжкістю ДР [22, 23]. Підвищений вміст протеїну S100A12 у плазмі був пов'язаний з ДР та вважається біомаркером тяжкості і прогресування ЦД [24]. За нашими результатами збільшення експресії протеїну S100 відбувалося раніше від інших маркерів.

Результати нашого дослідження доповнили уявлення про роль активації макроглії, елементи якої, піддаючись реактивному гліозу, сприяють накопиченню навколо капілярів на внутрішній поверхні сітківки високої концентрації факторів росту. Сітківка має широкі можливості для неоваскуляризації через свою високу метаболічну потребу, що може швидко вийти з-під контролю під впливом високої експресії VEGF [25]. Останній зумовлює появу мікроаневризм та крововиливів у сітківці, апоптоз перицитів та ендотеліальних клітин, неоваскуляризацію [26].

VEGF є кінцевим продуктом активації різних клітинних сигнальних шляхів, який вважається основним фактором розвитку ДР [27]. Він посилює процеси проліферації ендотеліоцитів, неоваскуляризації, підвищення судинної проникності, утворення колатералей [28]. Отже, цілком обґрунтовано

інтравітреальне введення анти-VEGF-препаратів, яке є стандартом терапії при лікуванні як ранніх, так і важких стадій ДР [29]. При цьому існує популяція пацієнтів, що не піддаються анти-VEGF-терапії навіть незважаючи на часті ін'єкції [30]. Цей факт спонукає до пошуку нових напрямків впливу на молекулярні події, що розгортаються при ДР, особливо на її ранніх доклінічних етапах. До таких можна віднести блокаду клітинних протеїнкіназ. Відомо, що каскад Ras/Raf-1/MEK/ERK опосередковував активацію експресії VEGF у сітківці [10], а білок, інгібітор кінази Raf-1, зупиняв розвиток ДР через гальмування шляху p38MAPK [11]. У наших дослідженнях показано попередження розвитку ДР і мікроангіопатії при застосуванні блокатора клітинних протеїнкіназ сорафенібу. При цьому разом із відсутністю морфологічних ознак ДР зменшувалася експресія протеїну S100, GFAP і VEGF. Це вказувало на комплексну дію сорафенібу щодо різних шляхів активації експресії факторів росту та маркерів реактивного гліозу.

ВИСНОВКИ

Таким чином, встановлений факт гальмування розвитку мікроангіопатії при експериментальній ДР дає змогу вважати блокаду клітинних протеїнкіназ перспективним напрямком лікування, що може суттєво доповнити та розширити можливості анти-VEGF-терапії, особливо на ранніх стадіях ураження сітківки. Ймовірним ініціюючим механізмом, що забезпечує розвиток мікроангіопатії при ДР, є реактивний гліоз сітківки з активацією експресії протеїну S100, GFAP і VEGF. Відповідно, механізмом гальмування розвитку мікроангіопатії сорафенібом можна вважати його пригнічення експресії маркерів реактивного гліозу та патологічного ангиогенезу.

Дослідження виконано за ініціативою кафедр патофізіології і офтальмології та опто-

метрії післядипломної освіти НМУ імені О.О. Богомольця (Київ, Україна) та фінансується за бюджетною програмою МОЗ України, державний реєстраційний номер 0122U001308.

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.

K.O. Usenko, S.O. Rykov, V.V. Likhodievsky, S.V. Ziablitshev

EARLY MECHANISMS OF MICROANGIOPATHY DEVELOPMENT AND THE EFFECT OF CELLULAR PROTEIN KINASE BLOCKADE IN EXPERIMENTAL DIABETIC RETINOPATHY

*Bogomolets National Medical University, Kyiv;
e-mail: zsv1965@gmail.com*

Among the molecular mechanisms of diabetic microangiopathy development, the key is the activation of glia, which is accompanied by the formation of specific markers: S100 protein, glial fibrillary acidic protein (GFAP), and vascular endothelial growth factor (VEGF). The aim of the study was to establish the early mechanisms of diabetic microangiopathy development and the effect of cellular protein kinase blockade on it. Diabetic retinopathy was modeled in male Wistar rats by a single injection of streptozotocin (50 mg/kg; “Sigma-Aldrich”, Co, China). Rats were divided into 3 groups: control, with insulin injection (30 U; “NovoNordiskA/S”, Denmark), and with insulin and sorafenib injection (55 mg/kg; “Cipla”, India). Immunohistochemical (for all markers) and immunoblotting (for GFAP) studies were performed. Ultrathin sections of the retina were examined using a PEM 125k microscope (“SELMPI”, Ukraine). An increase in the expression of all markers was found in the processes of Müller cells and astrocytes that formed muff-like plexuses around microaneurysms and newly formed capillaries. There was a sequence of marker activation: first, the expression of the S100 protein (astrocytic reaction) increased, then GFAP (involvement of Müller cells and reactive gliosis), and in the late period, VEGF, which caused the activation of pathological angiogenesis. Inhibition of the development of microangiopathy was established when blocking cellular protein kinases with sorafenib, which was associated with the suppression of the expression of the studied markers.

Key words: diabetic retinopathy; microangiopathy; reactive gliosis; S100; GFAP; VEGF; sorafenib.

REFERENCES

1. Sacedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, Colagiuri S, Guariguata L, Motala AA, Ogurtsova K, Shaw JE, Bright D, Williams R. IDF Diabetes Atlas Committee. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabet Res Clin Pract.* 2019 Nov;157:107843.
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. Abramoff MD, Fort PE, Han IC, Jayasundera KT, Sohn EH, Gardner TW. Approach for a clinically useful comprehensive classification of vascular and neural aspects of diabetic retinal disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018 Jan 1;59(1):519-27.
4. Madeira MH, Marques IP, Ferreira S, Tavares D, Santos T, Santos AR, Figueira J, Lobo C, Cunha-Vaz J. Retinal neurodegeneration in different risk phenotypes of diabetic retinal disease. *Front Neurosci.* 2021 Dec 21;15:800004.
5. Wang W, Lo ACY. Diabetic retinopathy: pathophysiology and treatments. *Int J Mol Sci.* 2018 Jun 20;19(6):1816.
6. Whitehead M, Wickremasinghe S, Osborne A, Van Wijngaarden P, Martin KR. Diabetic retinopathy: a complex pathophysiology requiring novel therapeutic strategies. *Expert Opin Biol Ther.* 2018 Dec;18(12):1257-70.
7. Sundstrom JM, Hernández C, Weber SR, Zhao Y, Dunkle-barger 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.
8. Sorrentino FS, Alkables M, Salsini G, Bonifazzi C, Perri P. The importance of glial cells in the homeostasis of the retinal microenvironment and their pivotal role in the course of diabetic retinopathy. *Life Sci.* 2016;162:54-9.
9. Mohammad G, Kowluru RA. Diabetic retinopathy and signaling mechanism for activation of matrix metalloproteinase-9. *J Cell Physiol.* 2012 Mar;227(3):1052-61.
10. 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.
11. Yu YY, Liu QP, Li MT, An P, Chen YY, Luan X, Lv C, Zhang H, Hu-Zhang-Qing-Mai-Yin. Inhibits proliferation of human retinal capillary endothelial cells exposed to high glucose. *Front Pharmacol.* 2021 Aug 6;12:732655.
12. Kernt M, Liegl RG, Rueping J, Neubauer AS, Haritoglou C, Lacknerbauer CA, Eibl KH, Ulbig MW, Kampik A. Sorafenib protects human optic nerve head astrocytes from light-induced overexpression of vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and placenta growth factor. *Growth Factor.* 2010 Jun;28(3):211-20. doi: 10.3109/08977191003604505.

13. Ziablitzev SV, Zhupan DB, Dyadyk OO. The influence of a benzodiazepine receptor agonist on the state of glia in the diabetic retinopathy. *Fiziol Zh.* 2023;69(6):33-42. [Ukrainian].
14. Ziablitzev SV, Zhupan DB, Tykhomyrov AO, Dyadyk OO. Benzodiazepine receptor agonist Carbacetam modulates the level of vascular endothelial growth factor in the retina of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Ukr Biochem J.* 2023;6(95):21-9.
15. Mikheytsava IM, Molchanuk NI, Amayed A, Kolomiichuk SG, Siroshantenko TI. Features of ultrastructural changes in the neurosensory elements of the retina of rats in the modeling of diabetic retinopathy on the background of axial myopia. *Fiziol Zh.* 2024; 70(1): 31-6. [Ukrainian].
16. Tykhomyrov AA, Pavlova AS, Nedzvetsky VS. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): on the 45th Anniversary of its discovery. *Neurophysiology.* 2016;48;54-71.
17. Ziablitzev SV, Vodanyk VV, Dyadyk OO. The influence of tyrosine protein kinases blockade on the vasculon-endothelial growth factor expression and diabetic retinopathy development. *Fiziol Zh.* 2023;69(5):22-32. [Ukrainian].
18. Duh EJ, Sun JK, Stitt AW. Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies. *JCI Insight.* 2017 Jul 20;2(14):e93751.
19. Mikheytsava IM. Current view on pathogenic mechanisms of diabetic retinopathy. *Fiziol Zh.* 2023; 69(3): 106-14. [Ukrainian].
20. Nian S, Lo ACY, Mi Y, Ren K, Yang D. Neurovascular unit in diabetic retinopathy: pathophysiological roles and potential therapeutical targets. *Eye Vis (Lond).* 2021 May 1;8(1):15.
21. Simó R, Simó-Servat O, Bogdanov P, Hernández C. Neurovascular unit: A new target for treating early stages of diabetic retinopathy. *Pharmaceutics.* 2021 Aug 23;13(8):1320.
22. Van Hove I, De Groef L, Boeckx B, Modave E, Hu TT, Beets K, Etienne I, Van Bergen T, Lambrechts D, Moons L, Feyen JHM, Porcu M. Single-cell transcriptome analysis of the Akimba mouse retina reveals cell-type-specific insights into the pathobiology of diabetic retinopathy. *Diabetologia.* 2020 Oct;63(10):2235-48.
23. Lim RR, Vaidya T, Gadde SG, Yadav NK, Sethu S, Hainsworth DP, Mohan RR, Ghosh A, Chaurasia SS. Correlation between systemic S100A8 and S100A9 levels and severity of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabet Metab Syndr.* 2019 Mar-Apr;13(2):1581-9.
24. Franco-Martínez L, Gelemanović A, Horvatić A, Contreras-Aguilar MD, Mrljak V, Cerón JJ, Martínez-Subiela S, Tvarijonaviciute A. The serum and saliva proteome of dogs with diabetes mellitus. *Animals (Basel).* 2020 Dec 1;10(12):2261.
25. Crespo-Garcia S, Tsuruda PR, Dejda A, Ryan RD, Fournier F, Chaney SY, Pilon F, Dogan T, et al. Pathological angiogenesis in retinopathy engages cellular senescence and is amenable to therapeutic elimination via BCL-xL inhibition. *Cell Metab.* 2021 Apr 6;33(4):818-32.e7.
26. Pitale PM, Gorbatyuk MS. Diabetic retinopathy: From animal models to cellular signaling. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 27;23(3):1487.
27. 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):e407-15.
28. Mehrabadi ME, Salemi Z, Babaie S, Panahi M. Effect of biochanin A on retina levels of vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Can J Diabet.* 2018 Dec;42(6):639-44.
29. Maturi RK, Glassman AR, Josic K, Antoszyk AN, Blodi BA, Jampol LM, Marcus DM, Martin DF, Melia M, Salehi-Had H, Stockdale CR, Punjabi OS, Sun JK. 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.
30. Virgili G, Parravano M, Evans JR, Gordon I, Lucenteforte E. Anti-vascular endothelial growth factor for diabetic macular oedema: a network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018 Oct 16;10(10):CD007419.

*Матеріал надійшов
до редакції 27.01.2025*