

Вплив блокади клітинних протеїнказ на апоптоз сітківки при експериментальній діабетичній ретинопатії

К.О. Усенко, С.О. Риков, Д.І. Євстіфєєв, С.В. Зябліцев

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

У експериментальних та клінічних дослідженнях підтверджено, що прогресуюче погіршення гостроти зору при діабетичній ретинопатії (ДР) є наслідком апоптозу нейрональних структур сітківки і фіброваскулярної проліферації на очному дні. Метою нашого дослідження було встановлення стану апоптозу сітківки при експериментальній ДР та вплив на нього блокади клітинних протеїнказ. Експериментальну ДР моделювали у щурів-самців лінії Вістар введенням стрептозоточину (50 мг/кг; "Sigma-Aldrich", Китай). Тваринам 1-ї групи (контроль) лікування гіперглікемії не проводили. У 2-ї групи тваринам через день вводили інсулін ("Actrapid HM Penfill", Данія) у дозі 30 Од. Тваринам 3-ї групи вводили розчин інгібітора протеїнказ сорафеніб ("Cipla", Індія) у дозі 50 мг/кг. Тваринам 4-ї групи вводили інсулін (за схемою 2-ї групи) і розчин сорафеніб (за схемою 3-ї групи). Вміст каспази-3 та протеїну Вах у лізатах тканини сітківки визначали методом імуноблотингу, також імуногістохімічно вивчали експресію каспази-3 ("ThermoFisher Scientific", США). При розвитку ДР вміст у сітківці як попередників, так і активних форм проапоптотичних протеїнів каспази-3 і Вах змінювався односпрямовано і приблизно рівномірно. Окреме застосування сорафеніб не впливало на індуковану гіперглікемією активацію апоптозу сітківки, тоді як введення інсуліну (і окремо, і у комбінації з сорафенібом) суттєво знижувало вміст обох проапоптотичних протеїнів, що свідчило про пригнічення апоптозу, який був індукований при розвитку ДР. Результати імуногістохімічного дослідження підтвердили збільшення експресії каспази-3 у гангліонарних клітинах, відростках та тілах астроцитів і клітин Мюллера, що супроводжувало стан реактивного гліозу, характерний для розвитку ДР. Зниження інтенсивності апоптозу під впливом інсуліну та його комбінації з сорафенібом могло відображати блокування інсуліном проапоптотичного ефекту сорафеніб. При цьому зберігалася притаманне дії сорафеніб попередження розвитку морфологічних ознак ДР. Ключові слова: діабетична ретинопатія; апоптоз; гангліонарні клітини; клітини Мюллера; протеїни Вах; каспаза-3; сорафеніб.

ВСТУП

Нині діабетична ретинопатія (ДР) залишається глобальною медико-соціальною проблемою, уражаючи 103,12 млн осіб, і, за оцінками, до 2045 р. ця кількість збільшиться до 160,5 млн [1]. ДР є найпоширенішим мікросудинним ускладненням цукрового діабету (ЦД), що пошкоджує сітківку і завершується сліпотою [2].

Мікросудинні зміни у сітківці є першими клінічними ознаками ДР і це призвело до помилкового переконання, що ДР є тільки

мікросудинним розладом [3]. Однак підвищений апоптоз нейрональних клітин сітківки передуює мікросудинним змінам, порушує функціонування нейро-васкулярної одиниці сітківки та цілісність гемато-ретинального бар'єра. Нейронний апоптоз починається ще до розвитку ознак ДР, залучаючи насамперед гангліонарні клітини [4]. Прямим наслідком збільшення апоптотичної смерті є зменшення товщини внутрішніх шарів сітківки та шару нервових волокон.

Дані багатьох досліджень, як в експериментальних моделях, так і в клініці під-

твердили, що прогресуюче погіршення гостроти зору при ДР є наслідком апоптозу нейрональних структур сітківки і масивної фіброваскулярної проліферації на очному дні [5]. Запрограмована загибель гангліонарних клітин сітківки відбувається через активацію каспаз вже на ранніх стадіях ДР. Пошук ключових механізмів цього процесу може виявити напрямки фармакологічної блокади апоптозу гангліонарних клітин.

Хоча доказів посилення апоптозу клітин сітківки багато, основні механізми все ще невідомі. Втрата різних класів клітин (нервових і судинних) відбувається протягом різних часових проміжків і, можливо, за непов'язаними механізмами, найважливішим з яких є оксидативний стрес [6]. Патохімічні зміни при гіперглікемії запускаються на біохімічному рівні і включають 4 основні ланки: поліоловий і гексозаміновий шляхи, утворення кінцевих продуктів глікації та активацію ізоформ протеїнінази С [7]. Діючи разом, вони викликають підвищення вмісту активних форм кисню та зниження ендогенних антиоксидантів, таким чином створюючи оксидативний стрес та ініціюючи апоптоз.

Важливе значення має мітохондріальна дисфункція, яка є прямим наслідком біохімічних порушень, що сприяють фрагментації мітохондрій з вивільненням цитохрому С і запуску апоптозу, зокрема в судинах сітківки та клітинах Мюллера [8]. Крім того, апоптоз нейронів часто пов'язаний із підвищеним вивільненням позаклітинного глутамату, який відіграє центральну роль як у хронічній, так і в гострій нейродегенерації [9].

Інша гіпотеза, яка пояснює апоптоз, полягає в тому, що діабет знижує кількість трофічних факторів або ефективність сигнальних механізмів факторів росту, які потрібні для виживання нейронів, перичитів і ендотеліальних клітин сітківки (фактора росту нервів, мозкового нейротрофічного фактора, тромбоцитарного фактора росту В тощо) [10].

Запалення низького ступеня має велике значення у патогенезі та розвитку апоптозу

при ДР, оскільки численні запальні фактори, такі як інтерлейкін-1 β , моноцитарний хемотаксичний білок-1 і фактор некрозу пухлини- α накопичуються в склоподібному тілі та сітківці пацієнтів з ДР [11]. Запальні чинники разом із факторами росту сприяють руйнуванню гемато-ретинального бар'єра, пошкодженню судин і нейрозапаленню, а також патологічному ангіогенезу. Крім того, мікроглія, глія Мюллера, астроцити, клітини пігментного епітелію сітківки активуються для секреції медіаторів запалення, посилюючи апоптоз нервових клітин.

Важливим механізмом діабетичних судинних ускладнень є ендотеліальна дисфункція, яка призводить до ДР, діабетичної нефропатії, нейропатії та атеросклероза [12]. При цьому апоптоз вважається ключовим фактором, що зумовлює загибель перичитів та ендотелію судин.

Таким чином, апоптоз є кінцевим тригером, на якому зосереджується вплив інших механізмів ДР. Відповідно, можна вважати, що фармакологічна корекція апоптозу має включати комплексну інтегративну дію на залучені чинники патогенезу. У наших попередніх дослідженнях було показано, що блокада клітинних протеїніназ мультикіназним інгібітором сорафенібом при стрептозотоциновому діабеті у щурів супроводжувалася зменшенням глікемії, попередженням розвитку морфологічних проявів ДР і пригніченням реактивного гліозу сітківки [13, 14]. Наведені міркування обґрунтовували необхідність встановлення впливу блокади клітинних протеїніназ на стан апоптозу сітківки при експериментальній ДР.

Метою нашого дослідження було встановлення стану апоптозу сітківки при експериментальній ДР та вплив на нього блокади клітинних протеїніназ.

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/ЕЕС (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 від 21.11.2022 р., № 164).

До дослідження залучено 65 тримісячних щурів-самців лінії Вістар масою 140–160 г. Експериментальний ЦД і ДР моделювали на 60 щурах одноразовим внутрішньоочеревинним введенням стрептозотоцину (50 мг/кг; “Sigma-Aldrich”, Китай), розчиненого у холодному 0,1 М цитратному буфері (рН 4,5); 5 тварин використано для отримання початкових значень (інтактні). Протягом 16 год до ін’єкції тварин не годували, а протягом 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. Через 3 доби після ін’єкції вміст глюкози у крові тварин, яким вводили стрептозотцин був не менше ніж 15 ммоль/л. За тваринами спостерігали протягом 3 міс.

Через 7 діб тварин зі стійкою гіперглікемією ($n = 60$) сліпим рандомним способом розділили на 4 групи по 15 особин. У 1-й групі (контроль) лікування гіперглікемії не проводили. У 2-й групі тваринам через день внутрішньоочеревинно вводили інсулін короткої дії (“Actrapid НМ Penfill”, Novo Nordisk A/S, Данія) у дозі 30 Од. Тваринам 3-ї групи *per os* щоденно вводили розчин інгібітора протеїнкіназ сорафенібу (“Cipla”, Індія) у дозі 50 мг/кг у вигляді соше. Тваринам 4-ї групи вводили інсулін (за схемою 2-ї

групи), а також розчин сорафенібу (за схемою 3-ї групи).

Тварин виводили з експерименту через 7, 14 і 28 діб та 3 міс за допомогою смертельної ін’єкції тіопенталу (75 мг/кг). Вміст каспази-3 та протеїну Вах у лізатах тканини сітківки визначали методом імуноблотингу. Зразки тканини витримували у скрапленому азоті, подрібнювали та гомогенізували у tris-HCl-буфері (рН 7,4) з додаванням інгібіторів фосфатаз та протеаз (“ThermoScientific”, США). Електрофорез проводили у 8%-му поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію у камері для вертикального гел’електрофорезу (“BioRad”, США). Протеїни з гелю переносили на нітроцелюлозну мембрану за допомогою електроблоту. Мембрани інкубували з моноклональними антитілами до каспази-3 (ABM1C12, “Abcam”, США) та до протеїну Вах (B3428, “Sigma Aldrich”, США). Антитіла до актину (β -actin MA5-15739, “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 вмісту виражали в умовних одиницях від контрольного значення оптичної густини відповідної поліпептидної зони на блотограмах, нормованої за вмістом актину в кожному зразку.

Для морфологічних досліджень очі занурювали у 10%-й розчин нейтрального формаліну та заливали в парафін. З парафінових блоків на ротаційному мікротомі НМ 325 (“Thermo Shandon”, Англія) виготовляли серійні гістологічні зрізи товщиною 2-3 мкм. Імуногістохімічне дослідження проводили з використанням моноклональних мишиних антитіл проти каспази-3 (74T2, “ThermoFisher Scientific”, США), застосовували систему

детекції Master Polymer Plus Detection (“Master Diagnostica”, Іспанія). Зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном. Мікроскопічне дослідження та фотоархівування проводили із використанням світлооптичних мікроскопів “ZEISS” з системою обробки результатів “Axio Imager. A2” (Німеччина). Оцінку вираженості експресії здійснювали згідно з рекомендаціями Dabbs [15] на підставі візуально-аналогової шкали: 0 балів – забарвлення відсутнє; 1 бал (+) – слабка інтенсивність забарвлення; 2 бали (++) – середня інтенсивність забарвлення; 3 бали (+++) – виска інтенсивність забарвлення.

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

РЕЗУЛЬТАТИ

Результати імуноблотингового дослідження показали суттєве збільшення вмісту проапоптотичних ензимів у ткани сітківки шурів контрольної групи через 3 міс спостереження (рис. 1).

Вміст обох форм каспази-3 був збільшеним порівняно з інтактними тваринами приблизно однаково (у 6,0–7,5 раза; $P < 0,05$). Лікування інсуліном супроводжувалося зниженням вмісту каспази-3 порівняно з контролем (у 2,1–2,2 раза; $P < 0,05$), однак вміст протеїнів значно перебільшував значення інтактних тварин (у 2,8–3,4 раза; $P < 0,05$). При лікуванні сорафенібом вміст каспази-3 був порівняним з вмістом у контрольних тварин (перевищував значення інтактних у 6,7–7,3 раза; $P < 0,05$). Комбіноване лікування інсуліном і сорафенібом, як і окреме застосування інсуліну, знижувало порівняно з контролем вміст обох форм каспази-3. Вміст протеїнів у цих групах майже не відрізнявся.

Про активне залучення мітохондріального шляху апоптозу свідчило значне збільшення активності як моно-, так і димерної форм протеїну Вах у контрольній групі (див. рис. 1). У інтактних тварин мономерна форма Вах не виявлялася, що вказувало на неактивний стан цього шляху апоптозу. При ДР вміст обох форм збільшувався (у 46,8 і 2,4 раза відповідно; $P < 0,05$). Цей факт свідчив про стимуляцію утворення протеїну Вах і його активної форми з відповідною активацією апоптозу за мітохондріальним шляхом. Застосування лікування мало схожу динаміку з каспазою-3: гальмування при дії інсуліну та відсутній вплив окремого введення сорафенібу.

Таким чином, при експериментальній ДР вміст у сітківці як попередників, так і активних форм проапоптотичних протеїнів каспази-3 і Вах змінювався односпрямовано і приблизно рівно. Це свідчило про активне залучення апоптозу у розвиток ДР. Окреме застосування сорафенібу не впливало на індуковану гіперглікемією активацію апоптозу сітківки, тоді як введення інсуліну (і окремо, і у комбінації з сорафенібом) суттєво знижувало вміст обох проапоптотичних протеїнів, що свідчило про пригнічення апоптозу, який був індукований при розвитку ДР.

Результати імуногістохімічного дослідження показали прогресуюче збільшення експресії каспази-3 у динаміці розвитку ДР (рис. 2, а–г).

Через 7 діб каспаза-3-позитивне забарвлення локалізувалося вздовж внутрішньої поверхні сітківки в гангліонарних клітинах та волокнах гліальних клітин (див. рис. 2, а). Інтенсивність забарвлення становила до 2 балів за шкалою Dabbs [15]. Через 14 діб кількість позитивно забарвлених елементів візуально збільшувалася (див. рис. 2, б). У внутрішньому плексиформному шарі, переважно на межі з шаром гангліонарних клітин, були помітні інтенсивно забарвлені радіальні волокна клітин Мюллера.

Через 28 діб щільність забарвлених елементів візуально збільшувалася, інтен-

сивність забарвлення сягала до 3 балів за шкалою Dabbs (див. рис. 2, в). У внутрішніх шарах сітківки інтенсивно забарвлювалися гангліонарні клітини, відростки клітин Мюллера разом з астроцитарними утворювали сплетення навколо розширених капілярів. У внутрішньому плексиформному шарі значно збільшувалася кількість радіальних відрост-

ків клітин Мюллера, які чітко візуалізувалися на великих відстанях.

Через 3 міс у контрольній групі виявлялися ознаки розвитку ранньої ДР (див. рис. 2, г). Вздовж внутрішньої поверхні сітківки розташовувалися численні мікроаневризми, навколо яких каспаза-3-позитивно забарвлені гліальні волокна утворювали муфто-

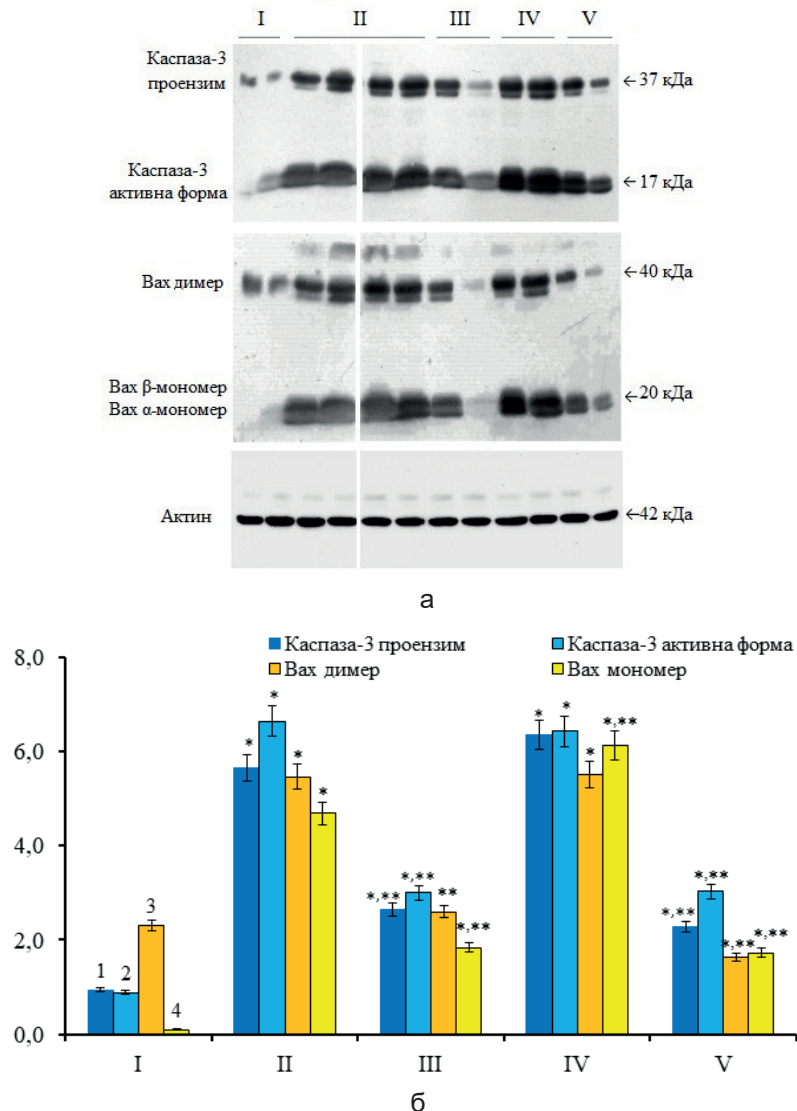


Рис. 1. Вміст проензиму (1) і активної форми (2) каспази-3, протеїнів Вах димеру (3) і мономеру (4) у тканині сітківки інтактних щурів (I) та через 3 міс у нелікованому контролі (II), при введенні інсуліну (III), сорафенібу (IV) і комбінованому введенні інсуліну і сорафенібу (V). а – репрезентативні блотограми каспази-3, протеїнів Вах і актину; б – результати денситометричного аналізу блотограм проензиму каспази-3, активної форми каспази-3, димеру і мономера протеїнів Вах (співвідношення до вмісту актину); * $P < 0,05$ порівняно зі значеннями в інтактних щурів; ** $P < 0,05$ порівняно з контролем

подібні сплетення. Відмічений набряк усіх шарів сітківки, особливо – внутрішнього плексиформного. У ядерних шарах сітківки утворювалися клітинні проліферати, що складалися з округлих базofilних щільно розташованих клітин. Проліферати виходили за межі шарів, у їх складі відмічено каспаза-3-позитивно забарвлені клітини та нервові волокна. Крім того, позитивне забарвлення було також у мілких дифузно розташованих клітинах зовнішнього плексиформного шару та внутрішньому сегменті фоторецепторів.

Застосування інсуліну певною мірою пригнічувало розвиток ранніх проявів ДР та знижу-

вало інтенсивність позитивного забарвлення у внутрішніх шарах сітківки (рис. 2, д). Дискмплексація ядерних шарів і каспаза-3-специфічне забарвлення були менш виражені. Натомість за шкалою Dabbs позитивні елементи мали досить високу інтенсивність (до 2-3 балів).

При застосуванні інсуліну з сорафенібом прояви ДР були мінімальними (рис. 2, е). Сітківка зберігала нормальну структуру, слабе каспаза-3-позитивне забарвлення відмічено переважно у волокнах астроцитів вздовж внутрішньої поверхні сітківки.

За результатами імуноблотингу окреме застосування сорафенібу призводило до

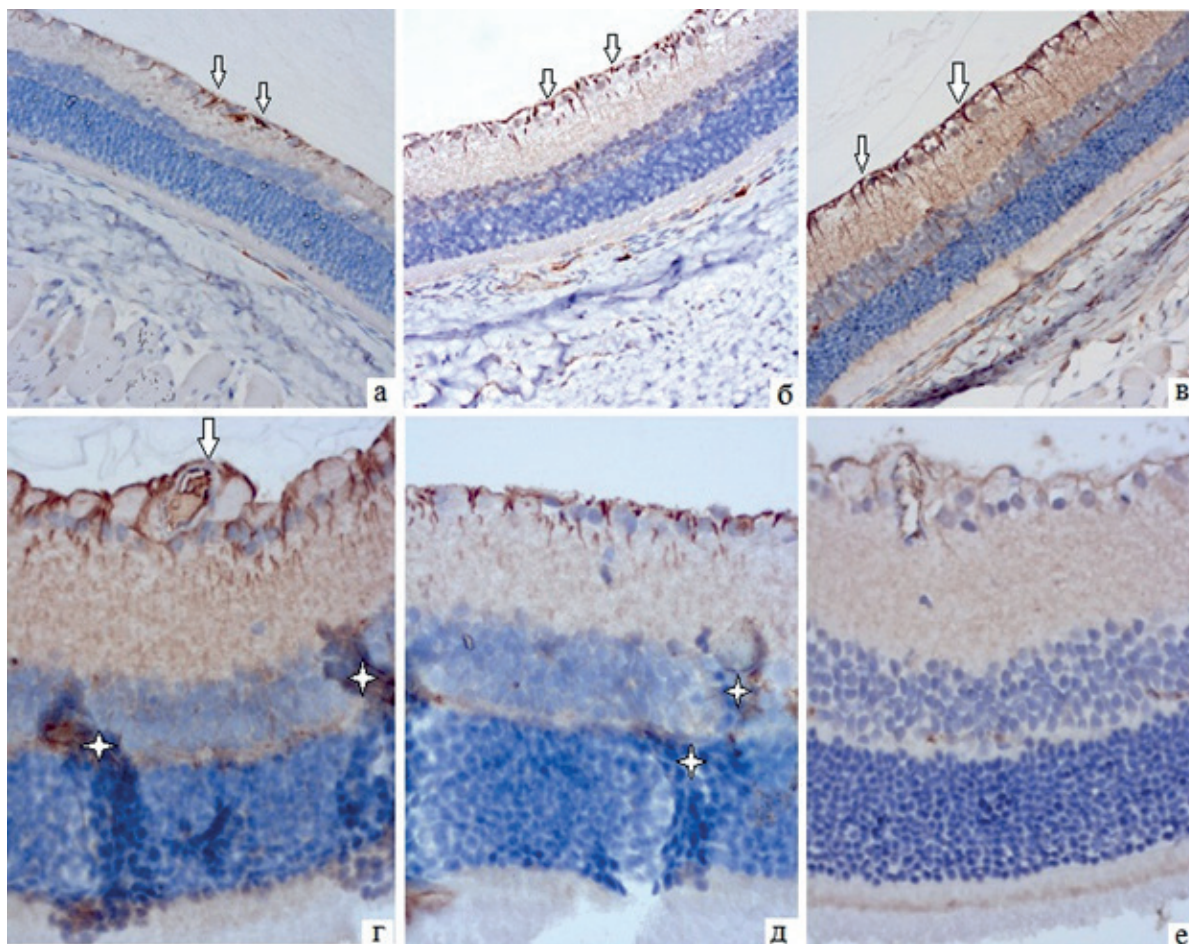


Рис. 2. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження вмісту каспази-3 у сітківці щура; а, б, в $\times 200$; г, д, е $\times 400$; дозабарвлення гематоксином; а, б, в, г – контрольна група без лікування через 7, 14, 28 діб та 3 міс; д, е – через 3 міс при введенні інсуліну (д) і інсуліну з сорафенібом (е); стрілочки – позитивно забарвлені клітини і волокна у шарі гангліонарних клітин та нервових волокон; зірочки – позитивно забарвлені елементи у складі клітинних проліфератів ядерних шарів сітківки

значного збільшення у тканинах сітківки каспази-3 та протеїнів Вах (див. рис. 1). На рис. 3 представлена картина сітківки при імуногістохімічному дослідженні каспази-3 щура цієї групи. Розподіл каспази-3-позитивних зон відповідав такому в інших групах, позитивно забарвлювалися деякі гангліонарні клітини та сплетення гліальних волокон навколо них, а також стінки судин внутрішнього судинного сплетіння сітківки. Ознаки ДР, що були притаманні нелікованому контролю були не вираженими.

Таким чином, результати імуногістохімічного дослідження підтвердили тенденцію до накопичення каспази-3 у тканинах сітківки та активації апоптозу при розвитку експериментальної ДР. Було уточнено, що найбільшою мірою апоптоз прогресував у гангліонарних клітинах, відростках та тілах астроцитів і

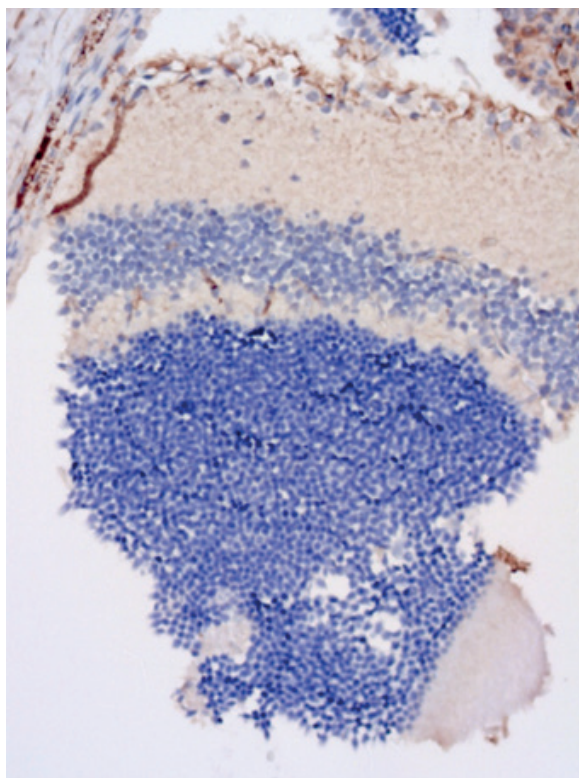


Рис. 3. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження каспази-3 у сітківці щура через 3 міс при застосуванні сорафенібу; $\times 400$; дозобарвлення гематоксиліном

клітин Мюллера, що могло супроводжувати стан реактивного гліозу, характерний для розвитку ДР [14]. Високий рівень апоптозу при окремій дії сорафенібу, який є характерною рисою застосування препарату [16], підтверджено і у наших дослідженнях.

Цікавим результатом було суттєве зниження інтенсивності апоптозу під впливом інсуліну та його комбінації з сорафенібом, що могло відображати блокування інсуліном проапоптотичного ефекту сорафенібу. Запобігання при цьому розвитку морфологічних ознак ДР вказувало на позитивний ефект сорафенібу та акцентувало увагу на необхідність його застосування з інсуліном при ДР.

ОБГОВОРЕННЯ

Підвищення рівнів експресії проапоптотичних протеїнів Вах, Fas, Fas/Fas-ліганд, активних каспаз-3, -8 та -9 у гангліонарних клітинах та сітківці людини та експериментальних щурів з ЦД добре відомо та узгоджувалося з отриманими нами результатами [17, 18].

Виявлення активованої каспази-3 є дуже надійним способом ідентифікації клітин, яким судилося загинути в результаті апоптозу, навіть до появи багатьох морфологічних характеристик (наприклад, фрагментації ДНК) [19]. У людей з ДР показана висока імунореактивність каспази-3, Fas і Вах у цитоплазмі гангліонарних клітин сітківки, імунореактивність Fas-ліганду була виявлена в клітинах макроглії [17]. У наших дослідженнях як імуногістохімічно, так і методом імуноблотингу підтверджено збільшення вмісту каспази-3 і протеїнів Вах у сітківці щурів з діабетом, що також стосувалося гангліонарних клітин і макроглії.

На моделі алоксанового діабету показано, що каспаза-3 активувалася в сітківці щурів через 14 міс, але не через 2 міс, а введення антиоксидантів протягом усього періоду пригнічувало цю активацію [20]. У наших попередніх дослідженнях була підтверджена рання активація каспази-3 і протеїну Вах

(вже з 7-ї доби після введення стрептозоточину) [21], що підтверджено результатами морфологічних досліджень і у цій роботі. Можливо застосування різних моделей відтворення діабету могло зумовити таку часову невідповідність отриманих результатів. Наші результати акцентували увагу на ранньому апоптозі гангліонарних клітин, який може реалізуватися через дію прозапальних факторів і інтенсифікацію оксидативного стресу з залученням як рецепторного, так і мітохондріального шляхів.

Щодо факту гальмування апоптозу під дією інсуліну треба зазначити, що інсулін є фактором виживання для нейронів сітківки [22]. Дія інсуліну стимулює їх розвиток, диференціацію, ріст, виживання і не впливає на метаболізм поживних речовин, наприклад, поглинання глюкози, як у скелетних м'язах. Можливо саме через трофічну функцію інсуліну сприяв зберіганню нейронів сітківки та гальмував розвиток ДР.

Сорафеніб є мультикіназним блокатором, який ефективно пригнічував ріст пухлини та ангіогенез через шляхи клітинних протеїніназ RAF/MEK/ERK і рецепторних тирозинкіназ, а також індукцію апоптозу [16]. Нині він визнаний препаратом першої лінії при лікуванні раку печінки. Показано, що окрім апоптозу, сорафеніб також може викликати фероптоз, який виникає за умов надмірного оксидативного стресу [23]. У культивованих клітинах U-2 остеосаркоми його дія призводила до стимуляції зовнішніх та внутрішніх шляхів апоптозу та інактивації ядерного фактора капа В [24]. Сорафеніб мав здатність порушувати розвиток пухлини пригніченням ангіогенезу та зниженням життєздатності пухлинних клітин при лікуванні феохромоцитоми [25].

Також сорафеніб гальмував розвиток ад'ювантного артриту у щурів через індукцію апоптозу фібробластоподібних синовіоцитів, що на думку авторів має потенційні терапевтичні наслідки [26]. У культивованих первинних астроцитах головки зорового

нерва людини він значно зменшував спричинену світлом гіперекспресію васкулярного ендотеліального фактора росту (VEGF), тромбоцитарного фактора росту і фактора росту плаценти, що свідчило про можливість використання препарату при потенційному підтримуючому лікуванні неоваскуляризації сітківки [27].

Пригнічення розвитку ключових механізмів ДР при дії сорафенібу показано у багатьох дослідженнях. Так, у щурів із ДР, індукованою стрептозоточинном, місцеве закапування наноструктурованої мікроемульсійної системи для доставки сорафенібу (NaMESys) пригнічувало експресію мРНК ядерного фактора каппа В, фактора некрозу пухлин α , інсуліноподібного фактора росту 1 та його рецептора, рецепторів VEGF 1 і 2 [28]. Сорафеніб блокує фосфорилування рецепторів VEGF утворенням нефункціональних водневих зв'язків у місці зв'язування АТФ [29]. Показано, що покращення цільової доставки сорафенібу в ділянці неоваскуляризації сітківки за допомогою наночасток золота може бути ефективним засобом лікування неоваскуляризації сітківки у пацієнтів з ДР через блокаду рецепторів VEGF [29]. Також використання завантажених сорафенібом кубосомних наноносіїв в експериментальній моделі ДР супроводжувалося зниженням експресії VEGF, прозапальних цитокінів і молекул адгезії [30].

Таким чином, сорафеніб через дію на внутрішньоклітинні молекулярні патогенетичні механізми здатний зменшувати прояви ДР, у тому числі ангіогенез, фіброзну проліферацію та нейродегенерацію. Велике значення має у цьому плані активація апоптозу, що підтверджено у клінічних та експериментальних дослідженнях.

Цікавою знахідкою цього дослідження виявилось те, що інсулін здатний до зменшення апоптозу сітківки, що підтверджено зниженням ретинального вмісту проапоптотичних протеїнів (каспази-3 та Вах) і ек-

спресії каспази-3 у гангліонарних клітинах та макроглії. Також інсулін блокував проапоптотичний ефект сорафенібу, хоча при їх сумісному застосуванні відмічено ефективне гальмування розвитку морфологічних проявів ДР. Цей факт зумовлював необхідність подальших досліджень молекулярних відносин при сумісній дії інсуліну і сорафенібу за умов ДР.

ВИСНОВКИ

Таким чином, показано суттєве багаторазове та прогресуюче збільшення вмісту проапоптотичних ензимів (проензиму каспази-3 та її активної форми, моно- і димерної форм протеїнів Вах) у тканині сітківки щурів протягом 3 міс спостереження при розвитку експериментальної ДР. Лікування тварин інсуліном знижувало вміст проапоптотичних ензимів та гальмувало морфологічні ознаки ДР. Лікування сорафенібом не знижувало вмісту ензимів, тоді як сумісне застосування інсуліну і сорафенібу супроводжувалося гальмуванням апоптозу при відсутності ознак ДР (мікроаневризм, клітинних проліфератів та нейродегенерації). Можливий практичний аспект роботи полягав у експериментальному обґрунтуванні сумісного використання сорафенібу з інсуліном, що може підвищувати ефективність окремого застосування цих препаратів при ДР.

Дослідження виконано за ініціативою кафедри патофізіології і офтальмології та оптометрії післядипломної освіти НМУ імені О.О. Богомольця (Київ) 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, D.I. Yevstifeiev, S.V. Ziablicev

EFFECTS OF CELLULAR PROTEIN KINASES BLOCKADE ON RETINAL APOPTOSIS IN EXPERIMENTAL DIABETIC RETINOPATHY

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

Experimental and clinical studies confirm that the progressive deterioration of visual acuity in diabetic retinopathy (DR) results from apoptosis of retinal neuronal structures and fibrovascular proliferation in the fundus. This study aimed to assess the extent of retinal apoptosis in experimental DR and evaluate the effects of cellular protein kinases blockade. Experimental DR was induced in male Wistar rats via streptozotocin administration (50 mg/kg; "Sigma-Aldrich", China). Group 1 (control) received no treatment for hyperglycemia. Group 2 received insulin ("Actrapid HM Penfil", Denmark) at 30 U every other day. Group 3 was treated with the protein kinase inhibitor sorafenib ("Cipla", India) at 50 mg/kg. Group 4 received both insulin (as in Group 2) and sorafenib (as in Group 3). Caspase-3 and Bax protein levels in retinal lysates were analyzed by immunoblotting, and caspase-3 expression was also assessed immunohistochemically ("ThermoFisher Scientific", USA). During DR progression, the levels of precursor and active forms of proapoptotic proteins caspase-3 and Bax increased in parallel. Sorafenib alone did not affect hyperglycemia-induced retinal apoptosis, whereas insulin, either alone or in combination with sorafenib, significantly reduced both proapoptotic markers, indicating suppression of DR-associated apoptosis. The immunohistochemical study results confirmed elevated caspase-3 expression in ganglion cells, as well as in the processes and bodies of astrocytes and Müller cells, reflecting reactive gliosis typical of DR. The reduction of apoptosis with insulin treatment, alone or combined with sorafenib, suggests that insulin may counteract sorafenib's potential proapoptotic effects, while preserving sorafenib's ability to prevent DR-related morphological changes.

Key words: diabetic retinopathy; apoptosis; ganglion cells; Müller cells; Bax proteins; caspase-3; sorafenib.

REFERENCES

1. Teo ZL, Tham YC, Yu M, Chee ML, Rim TH, Cheung N, et al. Global prevalence of diabetic retinopathy and projection of burden through 2045: Systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*. 2021 Nov;128(11):1580-91. doi: 10.1016/j.ophtha.2021.04.027.
2. Kaur A, Kumar R, Sharma A. Diabetic retinopathy leading to blindness- A review. *Curr Diabet Rev*. 2024;20(9):e240124225997. doi: 10.2174/0115733998274599231109034741.
3. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research

- Group. Grading Diabetic Retinopathy from Stereoscopic Color Fundus Photographs - An Extension of the Modified Airlie House Classification: ETDRS Report Number 10. *Ophthalmology*. 2020 Apr;127(4S):S99-S119. doi: 10.1016/j.ophtha.2020.01.030.
4. Fragiotta S, Pinazo-Durán MD, Scuderi G. Understanding neurodegeneration from a clinical and therapeutic perspective in early diabetic retinopathy. *Nutrients*. 2022 Feb 14;14(4):792. doi: 10.3390/nu14040792.
 5. Adamiec-Mroczek J, Zając-Pytrus H, Misiuk-Hojło M. Caspase-dependent apoptosis of retinal ganglion cells during the development of diabetic retinopathy. *Adv Clin Exp Med*. 2015 May-Jun;24(3):531-5. doi: 10.17219/acem/31805.
 6. Zhang M, Zhang R, Zhao X, Ma Z, Xin J, Xu S, Guo D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of ocular diseases: An overview. *Mol Biol Rep*. 2024 Mar 27;51(1):454. doi: 10.1007/s11033-024-09425-5.
 7. ValdezGuerrero AS, Quintana-Pérez JC, Arellano-Mendoza MG, Castañeda-Ibarra FJ, Tamay-Cach F, Alemán-González-Duhart D. Diabetic retinopathy: Important biochemical alterations and the main treatment strategies. *Can J Diabet*. 2021 Aug;45(6):504-11. doi: 10.1016/j.jcjd.2020.10.009.
 8. Roy S, Kim D, Sankaramoorthy A. Mitochondrial structural changes in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Clin Med*. 2019 Sep 1;8(9):1363. doi: 10.3390/jcm8091363.
 9. Callan A, Jha S, Valdez L, Tsin A. Cellular and molecular mechanisms of neuronal degeneration in early-stage diabetic retinopathy. *Curr Vasc Pharmacol*. 2024;22(5):301-15. doi: 10.2174/0115701611272737240426050930. PMID: 38693745.
 10. Barber AJ, Gardner TW, Abcouwer SF. The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Feb 28;52(2):1156-63. doi: 10.1167/iovs.10-6293.
 11. Tang L, Xu GT, Zhang JF. Inflammation in diabetic retinopathy: possible roles in pathogenesis and potential implications for therapy. *Neural Regen Res*. 2023 May;18(5):976-82. doi: 10.4103/1673-5374.355743.
 12. Shen J, San W, Zheng Y, Zhang S, Cao D, Chen Y, Meng G. Different types of cell death in diabetic endothelial dysfunction. *Biomed Pharmacother*. 2023 Dec;168:115802. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115802.
 13. Ziablitzev SV, Usenko KO, Dobrovinska OV, Perepelytsa YuV, Andrushchenko VA. The metabolic effect of cellular protein kinases blockade on the experimental diabetes. *Fiziol Zh*. 2024;3(70):16-26. doi: 10.15407/fz70.03.016.
 14. Usenko KO, Rykov SO, Dyadyk OO, Ziablitzev SV. Effect of cellular protein kinases blockade on the s100 retina expression in experimental diabetic retinopathy. *Pathologia*. 2024; 21(3):226-31. doi: 10.14739/2310-1237.2024.3.316604.
 15. Dabbs D. *Diagnostic Immunohistochemistry, 4th Edition Theranostic and genomic applications*. 2014.
 16. Abdelgalil AA, Alkahtani HM, Al-Jenoobi FI. Sorafenib. *Prof Drug Subst Excip Relat Methodol*. 2019;44:239-66. doi: 10.1016/bs.podrm.2018.11.003.
 17. Abu-El-Asrar AM, Dralands L, Missotten L, Al-Jadaan IA, Geboes K. Expression of apoptosis markers in the retinas of human subjects with diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Aug;45(8):2760-6. doi: 10.1167/iovs.03-1392.
 18. Wang T, Zhang Z, Song C, Sun L, Sui X, Qu Q, Liu J. Astragaloside IV protects retinal pigment epithelial cells from apoptosis by upregulating miR128 expression in diabetic rats. *Int J Mol Med*. 2020 Jul;46(1):340-50. doi: 10.3892/ijmm.2020.4588.
 19. Stadelmann C, Lassmann H. Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res*. 2000 Jul;301(1):19-31. doi: 10.1007/s004410000203.
 20. Kowluru RA, Koppolu P. Diabetes-induced activation of caspase-3 in retina: effect of antioxidant therapy. *Free Radic Res*. 2002 Sep;36(9):993-9. doi: 10.1080/1071576021000006572.
 21. Ziablitzev SV, Vodanyk VV. Retinal apoptosis and the effect of tyrosine kinase inhibition in experimental diabetes. *J Ophthalmol (Ukraine)*. 2023;5(514):34-40. doi: 10.31288/oftalmolzh202353440.
 22. Reiter CE, Gardner TW. Functions of insulin and insulin receptor signaling in retina: possible implications for diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res*. 2003 Jul;22(4):545-62. doi: 10.1016/s1350-9462(03)00035-1.
 23. Li Q, Chen K, Zhang T, Jiang D, Chen L, Jiang J, Zhang C, Li S. Understanding sorafenib-induced ferroptosis and resistance mechanisms: Implications for cancer therapy. *Eur J Pharmacol*. 2023 Sep 15;955:175913. doi: 10.1016/j.ejphar.2023.175913.
 24. Wu CH, Lin KH, Fu BS, Hsu FT, Tsai JJ, Weng MC, Pan PJ. Sorafenib Induces apoptosis and inhibits NF-κB-mediated anti-apoptotic and metastatic potential in osteosarcoma cells. *Anticancer Res*. 2021 Mar;41(3):1251-9. doi: 10.21873/anticancer.14882.
 25. Denorme M, Yon L, Roux C, Gonzalez BJ, Baudin E, Anouar Y, Dubessy C. Both sunitinib and sorafenib are effective treatments for pheochromocytoma in a xenograft model. *Cancer Lett*. 2014 Oct 1;352(2):236-44. doi: 10.1016/j.canlet.2014.07.005.
 26. Wang ZZ, Huang TY, Gong YF, Zhang XM, Feng-Wang, Huang XY. Effects of sorafenib on fibroblast-like synoviocyte apoptosis in rats with adjuvant arthritis. *Int Immunopharmacol*. 2020 Jun;83:106418. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106418.
 27. Kernt M, Liegl RG, Rueping J, Neubauer AS, Haritoglou C, Lackerbauer 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.
 28. Santonocito M, Zappulla C, Viola S, La Rosa LR, Solfato E, Abbate I, Tarallo V, Apicella I, Platania CBM, Maugeri G, D'Agata V, Bucolo C, De Falco S, Mazzone MG, Giuliano F. Assessment of a new nanostructured microemulsion system for ocular delivery of sorafenib

- to posterior segment of the eye. Int J Mol Sci. 2021 Apr 22;22(9):4404. doi: 10.3390/ijms22094404.
29. Dave V, Sharma R, Gupta C, Sur S. Folic acid modified gold nanoparticle for targeted delivery of sorafenib tosylate towards the treatment of diabetic retinopathy. Colloid Surf B Biointerface. 2020 Oct;194:111151. doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.111151.
30. Madhusudhan S, Gupta NV, Rahamathulla M, Chidambaram SB, Osmani RAM, Ghazwani M, Ahmed MM, Farhana SA, Sarhan MY, Tousif AH. Subconjunctival delivery of sorafenib-tosylate-loaded cubosomes for facilitated diabetic retinopathy treatment: Formulation development, evaluation, pharmacokinetic and pharmacodynamic (PKPD) studies. Pharmaceutics. 2023 Oct 4;15(10):2419. doi: 10.3390/pharmaceutics15102419.

*Матеріал надійшов
до редакції 10.04.2025*