

Експериментальні дослідження

УДК 617.735-02:616.379-008.64

Стан S100-позитивної глії та вплив на неї агоністу ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетаму при діабетичній ретинопатії

С. В. Зяблицев, д-р мед. наук, професор; Д. Б. Жупан, аспірант, лікар-офтальмолог

Національний медичний
університет імені
О.О. Богомольця
Київ (Україна)

Мета – встановлення стану S100-позитивної глії та впливу на неї агоністу ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетаму на початкових стадіях розвитку експериментальної діабетичної ретинопатії (ДР).

Матеріал та методи. У 30 трьохмісячних щурів-самців лінії Wistar моделювали ДР шляхом одноразового введення стрептозоцину (50 мг/кг; Sigma-Aldrich, Co, China). Щурів було розподілено на 3 групи (по 10 тварин): контрольна, з введенням інсуліну (30 Од; NovoNordiskA/S, Bagsvaerd, Denmark) і з введенням інсуліну і карбацетаму (5 мг/кг). Для визначення початкових даних використано 5 інтактних тварин. Імуногістохімічно у сітківці виявляли білок S100 (Monoclonal Antibody; Thermo Fisher Scientific, USA).

Результати. В інтактній сітківці S100-позитивне забарвлення мали тіла багаточисельних поліморфних клітин внутрішнього ядерного шару, та гліальні волокна, що муфтоподібно охоплювали гангліонарні нейрони. При розвитку ДР інтенсивність S100-позитивного забарвлення клітин Мюллера значно зростала, чітко візуалізувалися їх довгі радіальні відростки. Інтенсивне забарвлення відмічено у зовнішньому ядерному шарі та на його межі з шаром паличок і колбочок, а також – у шарі гангліонарних клітин. На 28-у добу у внутрішніх шарах сітківки виявлялися мікроаневризми, з якими щільно контактували інтенсивно забарвлені S100-позитивні волокна. Застосування інсуліну приводило к послабленню інтенсивності S100-позитивного забарвлення, а комбіноване введення інсуліну і карбацетаму гальмувало експресію білка S100 і запобігало утворенню мікроаневризм сітківки: на 28-у добу забарвлення слабкої інтенсивності зберігалося тільки у поодиноких клітинах Мюллера внутрішнього ядерного шару та у сплетінні волокон гангліонарного шару.

Висновок. Таким чином, встановлено гальмівний ефект агоністу бензодіазепінових рецепторів карбацетаму на експресію білка S100 та утворення мікроаневризм сітківки на початкових стадіях розвитку ДР при стрептозоцин-індукованому діабеті у щурів.

Ключові слова:

діабетична ретинопатія,
нейродегенерація,
бензодіазепіновий рецептор,
імуногістохімія, стрептозоцин,
клітини Мюллера, білок S100,
сітківка

Вступ. Погано контрольований або нелікований цукровий діабет (ЦД) призводить до багатьох серйозних діабет-асоційованих ускладнень, в тому числі, діабетичної ретинопатії (ДР), нейропатії, нефропатії, тощо [1]. ДР вражає майже третину пацієнтів із ЦД і є основною причиною сліпоти серед дорослого працездатного населення [2].

З класичних позицій ДР включає прогресуючі зміни у мікроциркуляторному руслі, які призводять до ішемії, неоваскуляризації, збільшення проникності сітківки і макулярного набряку [3]. Більш сучасна концепція включає розуміння, що поряд з мікросудинними ураженнями прогресують тканинспецифічні нейродегенеративні прояви, які мають свій складний

багатофакторний патогенез [4]. Сучасна класифікація ДР заснована на видимих мікросудинних змінах сітківки і не враховує нейродегенеративних уражень, які можуть виникати ще до появи васкулопатії [5]. Розвитку нейродегенеративних змін сприяють порушення аксональної передачі та метаболічних шляхів, втрата енергії внаслідок пошкодження мітохондрій та неправильного фолдингу білків, нейрозапалення, вірусні інфекції, мутації ДНК та інші фактори [6]. Відомо, що нейрональна дисфункція при ДР є незалежним патофізіологічним механізмом, який розвивається одночасно з ангиопатією [7].

Найважливішим нейрохімічним механізмом при ДР є ексайтотоксичність надмірного глутамату, що через перенавантаження клітин кальцієм підсилює процеси метаболізму, каспазного каскаду й апоптозу [8]. Глутамат-опосередкована збуджуюча та ГАМК-опосередкована гальмівна синаптичні передачі важливі для підтримки балансу збудження/гальмування в нервовій системі [9]. Субодиниці ГАМК-рецепторів виявлені на всіх нейронах сітківки, включаючи амакринові та гангліонарні [10]. В умовах ЦД виявлено зниження активності ГАМК-ергічних рецепторів у сітківці, при їхньому блокуванні прискорювалася загибель гангліонарних клітин [11].

Білки S-100, що зв'язують кальцій, є членами гетерогенної родини білків, здатних буферизувати внутрішньоклітинну концентрацію іонів кальцію [12]. Вони регулюють проліферацію, диференціювання, апоптоз, енергетичний метаболізм, запалення та міграцію імунних клітин. Так, білки S100 збільшують інфільтрацію мікроглії та макрофагів у мишачій моделі ДР, також повідомлялося про збільшення рівнів білків S100A8 та S100A9 у плазмі пацієнтів із ЦД, що корелювало з тяжкістю ДР [13].

Враховуючи встановлений дефіцит ГАМК-ергічної медіації при ДР перспективним для його відновлення здається застосування агоністів рецепторів ГАМК, наприклад – бензодіазепінів [14]. Одним з представників бензодіазепінів є карбацетам, що був розроблений в Інституті фізико-органічної хімії та вуглехімії НАН України. Він є похідним β -карболіну та являє собою карболіновий ізостер (1-оксо-3,3,6-триметил-1,2,3,4-тетрагідроіндоло [2,3 с]хінолін). Препарат має антиамнестичну, анксиолітичну, антигіпоксичну, протинабрякову і протишокову дії та може вважатися перспективним нейропротектором [15, 16].

Мета: встановити стан S100-позитивної глії та вплив на неї агоністу ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетаму на початкових стадіях розвитку експериментальної ДР.

Матеріал і методи

При виконанні роботи керувалися нормами та принципами Директиви 2010/63 ЄС із захисту тварин, Гельсінської декларації (2008) та вимогами Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№1759-VI від 15.12.2009), а також висновком Комісії з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень Національного медичного університету імені О.О. Богомольця № 164 від 21.11.2022 р. Тварин тримали в умовах віварію на стандартному раціоні.

ЦД моделювали у 30 тримісячних щурах-самцях лінії Вістар масою 140-160 г одноразовою внутрішньоочеревинною ін'єкцією стрептозоточину (50 мг/кг; «Sigma-Aldrich», Китай) [17]. Тварин (по 10 тварин у кожній групі) розділили на 3 групи: в 1-й (контроль) вводили 0,5 мл фізіологічного розчину; у 2-й – інсулін (ActrapidHMPenfill, «NovoNordiskA/S», Данія) у дозі

30 Од, в 3-й – інсулін у той самій дозі комбінували з карбацетамом (5 мг/кг в 0,5 мл фізіологічного розчину). Препарати вводили внутрішньочеревинно через день, починаючи з 7-го дня після ін'єкції стрептозоточину, протягом 28 діб. Також використано 5 інтактних тварин для дослідження початкового стану сітківки.

Карбацетам був синтезований 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-ChekInstant, «Roche», Німеччина) у крові, забраної з хвостової вени натще. У тварин всіх груп протягом спостереження вміст глюкози у крові був стабільно високим та на 28-у добу у контрольній групі становив $29,32 \pm 1,25$ ммоль/л, у 1-ї та 2-ї групах $17,02 \pm 1,03$ і $14,38 \pm 1,25$ ммоль/л, відповідно ($P < 0,05$ порівняно з контрольною групою).

Тварин через 7, 14 і 28 днів 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 ротатійному мікротомі HM 325 («Thermo Shandon», Англія) виготовляли серійні гістологічні зрізи товщиною 2–3 мкм. Імуногістохімічне дослідження проводили з використанням моноклональних мишиних антитіл до S100 («Thermo Fisher Scientific», США). Зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном. Мікроскопію та фотоархівування проводили із використанням світлооптичних мікроскопів «ZEISS» (Німеччина) з системою обробки результатів «AxioImager. A2». Оцінку виразності експресії проводили згідно рекомендаціям D. Dabbs (2014) на підставі візуально-аналогової шкали: 0 балів – забарвлення відсутнє; 1 бал (+) – слабка інтенсивність забарвлення; 2 бали (++) – середня інтенсивність забарвлення; 3 бали (+++) – висока інтенсивність забарвлення [18].

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

Результати

Морфологічна картина інтактною сітківки відрізнялася чітким розділенням шарів та імуноспецифічним забарвленням S100-позитивних клітин та їх відростків з інтенсивністю за шкалою D. Dabbs 2-3 бали (рис. 1; рис. 2 а, б). Найбільш інтенсивно були забарвлені поліморфні клітини внутрішнього ядерного шару (білі стрілки на рис.1), які відповідали морфології клітин Мюллера, а також амакринових, біполярних та горизонтальних нейронів [12]. Їх відростки були позитивно забарвлені тільки поблизу клітин. Також інтенсивно забарвлювалися гліальні елементи навколо тіл гангліо-

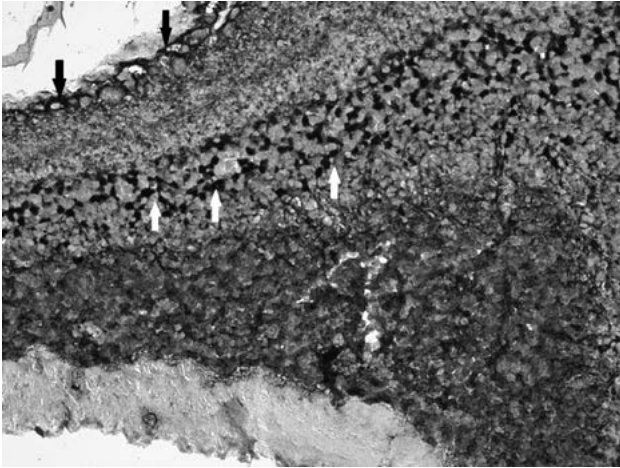


Рис. 1. Мікропрепарат сітківки щура до моделювання цукрового діабету. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження білка S100, дозабарвлення гематоксиліном; $\times 400$.

Примітки: чорні стрілки – імунопозитивне забарвлення гліальних волокон у шарі гангліонарних клітин; білі стрілки – поліморфні численні S100-позитивні клітини внутрішнього ядерного шару.

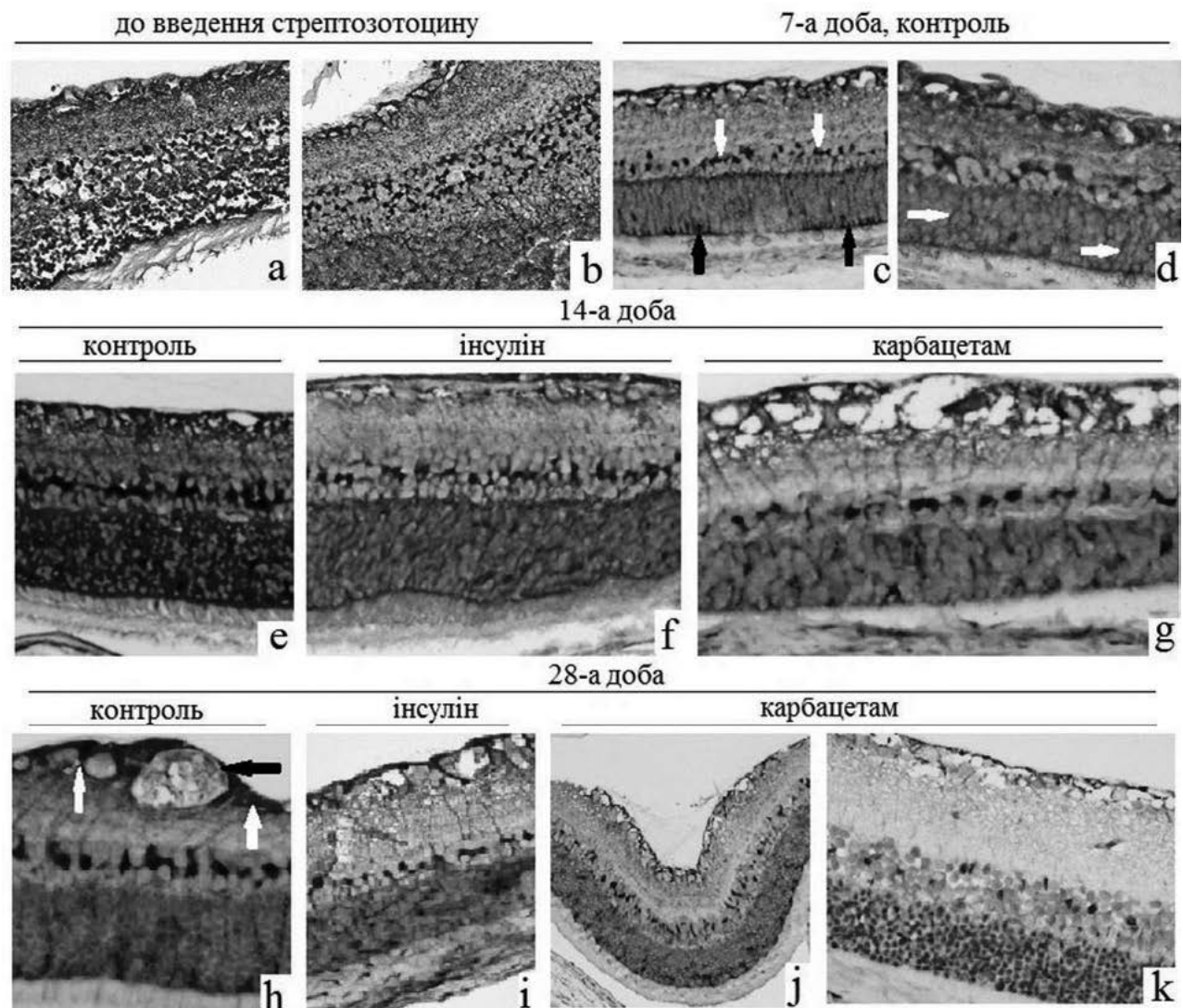


Рис. 2. Мікропрепарати сітківки щурів. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження білка S100, дозабарвлення гематоксиліном. а, с, j – $\times 200$; решта – $\times 400$; а, b – до моделювання цукрового діабету; с, d – 7-а доба; е, f, g – 14-а доба; h, i, j, k – 28-а доба.

Примітки: білі стрілки на с – S100-позитивні клітини внутрішнього ядерного шару; чорні стрілки на с – S100-позитивно забарвлені частини клітин пігментного епітелію, що подовжувалися у зовнішній ядерний шар; білі стрілки на d – радіальні гліальні волокна у зовнішніх шарах сітківки; чорна стрілочка на h – мікроаневризми на внутрішній поверхні сітківки; білі стрілки на h – сплетіння S100-позитивних гліальних волокон навколо аневризми.

нарних нейронів (чорні стрілки на рис. 1), які як муфта охоплювали тіла цих нейронів.

На 7-му добу у контрольній групі інтенсивне позитивне забарвлення лишилося тільки у клітинах, що розташовувалися у внутрішньому ядерному шарі, переважно посередині (білі стрілки на рис. 2 с). За морфологією їх можна було віднести до клітин Мюллера. Також у вигляді облямівки позитивно забарвлювалися частини клітин пігментного епітелію, що подовжувалися у зовнішній ядерний шар (чорні стрілки на рис. 2 с). Інтенсивно забарвлювалися відростки клітин Мюллера, що радіально перетинали зовнішній ядерний шар (білі стрілки на рис. 2 d).

На 14-ту добу у контролі інтенсивність забарвлення була максимальною (до 4 балів за шкалою D. Dabbs; рис. 2 е). Інтенсивне забарвлення відмічено у зовнішньому ядерному шарі та на його межі з шаром паличок і колбочок, а також – у шарі гангліонарних клітин. Загальне послаблення інтенсивності забарвлення на цей термін було характерно для дії інсуліну та карбацетаму (рис. 2 f, g). Забарвлення до 2 балів відмічено у клітинах Мюллера, волокнах та поодиноких полігональних відросткових клітинах зовнішніх шарів сітківки.

На 28-у добу в контролі з'являлися вогнища патологічного ангиогенезу – мікроаневризми (чорна стрілка на рис. 2 h), які мали значно розширені судини, інколи з декількома просвітами, щільно розташованих один до одного і огорнутих товстою периваскулярною мембраною, що відповідало раннім проявам непроліферативної ДР (мікроангіоми та невеликі точкові кровотечі [12]). З мікроаневризмами щільно контактували інтенсивно забарвлені S100-позитивні відростки (білі стрілки на рис. 2 h).

Менш виражене забарвлення було притаманним дії інсуліну (рис. 2 i), морфологічна картина в цілому відповідала такій на попередньому терміні – інтенсивно забарвлювалися крупні відросткові клітини внутрішнього ядерного шару, радіальні відростки внутрішнього плексіформного шару та поодинокі клітини і переплетені волокна зовнішнього ядерного шару.

Найменший ступінь забарвлення був притаманний дії карбацетаму (рис. 2 j, k). Забарвлення до 2 балів спостерігалось у поодиноких клітинах Мюллера внутрішнього ядерного шару та сплетінні волокон гангліонарного шару. Також для цієї групи була характерна відсутність аневризми внутрішніх шарів сітківки.

Підрахування долі клітин у внутрішньому ядерному шарі з різною інтенсивністю імунопозитивного забарвлення за шкалою D. Dabbs на 28-му добу підтвердило отримані результати (рис. 3).

У контрольній групі переважна кількість клітин ($85 \pm 6,4\%$) мала інтенсивне забарвлення (2-3 бали). При введенні інсуліну переважали клітини зі слабкою інтенсивністю забарвлення (1-2 бали; $66 \pm 4,8\%$). Дія карбацетаму супроводжувалася наростанням долі клітин зі слабким забарвленням (0-1 бал; $57 \pm 3,6\%$; $p < 0,05$).

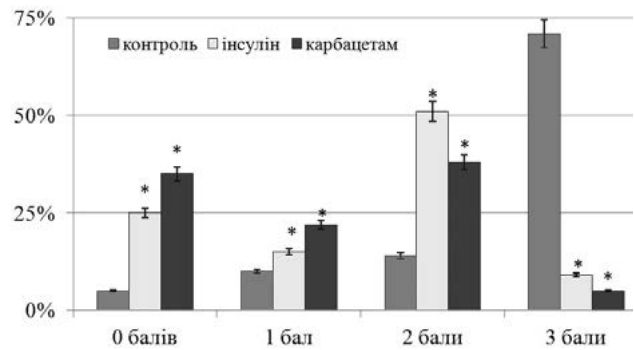


Рис. 3. Гістограма розподілу кількості S100-позитивних клітин (%) у внутрішньому ядерному шарі в залежності від інтенсивності імуноспецифічного забарвлення за шкалою D. Dabbs [18] у групах тварин на 28-му добу;

Примітка. * – рівень значущості показників – $p < 0,05$ у порівнянні з контролем.

Таким чином, розвиток ранньої ДР характеризувався наростанням інтенсивності S100-позитивного забарвлення клітин Мюллера у внутрішньому ядерному шарі, сплетінні нервових волокон гангліонарного шару, радіальних волокон зовнішніх шарів сітківки та шарі пігментного епітелію. Застосування інсуліну ці прояви зменшувало, а застосування разом з інсуліном карбацетаму – попереджувало активацію S100-позитивної глії сітківки.

Обговорення

Відомо, що хронічна гіперглікемія, оксидативний стрес, накопичення кінцевих продуктів глікування (AGEs) та глутамату є основними механізмами у процесі пошкодження нервових клітин сітківки, що призводять до розвитку діабетичної нейродегенерації сітківки [5, 19]. До її ознак включають реактивний гліоз, втрату функцій та апоптоз нейронів, що можуть передувати розвитку клінічно значущої мікроангіопатії [20]. Показано, що нейрони всіх шарів сітківки (гангліонарні, біполярні, амакринові та фоторецепторні) демонстрували змінені функції (при оцінці за допомогою електроретинографії та аналізу центрального зору в умовах зниженої контрастності та яскравості) ще до виявлення мікроангіопатії (оцінка за допомогою фотографії очного дна) [20].

Цитопатологічні зміни при ДР торкаються як мінімум дев'яти видів клітин сітківки, включаючи перичити, клітини пігментного епітелію сітківки, горизонтальні, біполярні та амакринові клітини, фоторецептори, гангліонарні клітини сітківки, мікро- та макроглію [4]. З ушкодженням глії тісно пов'язана низка механізмів, найважливішим з яких є збуджуюча токсичність глутамату, що підсилює процеси метаболізму, каспазного каскаду і апоптозу. Пусковим механізмом цих пошкоджень є накопичення внутрішньоклітинного кальцію, що дозволяє вважати активацію експресії кальцій-зв'язуючих білків відображенням протектив-

них механізмів, але, разом з цим – й маркером кальцієвого перенавантаження нервових клітин [21].

У нашому дослідженні у щурів на початку дослідження (ще до моделювання ЦД) виявлені особливості розподілу тканинної експресії білку S100 у сітківці. Інтенсивне забарвлення численних поліморфних клітин внутрішнього ядерного шару підтверджувало конститутивний характер експресії S100, який приймає активну участь у регуляції функцій нервових клітин [12]. Відростки цих клітин були позитивно забарвлені тільки поблизу від їх тіл, що вказувало на переважно соматичну локалізацію S100.

Нервові волокна, які мали інтенсивне забарвлення та утворювали щільні округлі муфти навколо гангліонарних клітин, на нашу думку, могли мати астроцитарне походження. У відповідь на метаболічний стрес за умов гіперглікемії астроцити продукують прозапальні інтерлейкіни, хемокіни, циклооксигеназу-2, численні фактори росту, які беруть участь у активації мікроглії, рекрутуванні моноцитів/макрофагів, Т-клітин та дендритних клітин, посилюючи запальну реакцію [22]. Астроцити сітківки в нормі експресують GFAP, у той час як у клітинах Мюллера ця експресія значно нижча [23].

Нашими попередніми дослідженнями показано, що у аналогічному експерименті з моделюванням ранньої ДР, окремі GFAP-позитивні клітини та їх відростки виявлялися на початку експерименту тільки у шарах гангліонарних клітин та нервових волокон і тільки поодинокі дифузно розташовані GFAP-позитивні клітини (ймовірно клітини Мюллера) виявлялися у внутрішньому ядерному шарі [24]. У процесі розвитку ДР появлялися 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 динаміку залучення клітин Мюллера, які у нормі слабо експресують GFAP, але активуються при ЦД [25].

На відміну від GFAP, білок S100 мав досить високий рівень експресії у нервових клітинах сітківки в нормі. У подальшому розвиток ДР супроводжувався надекспресією клітинами внутрішніх шарів сітківки як GFAP, так і S100. Це відображало їх надмірну активацію та, враховуючи можливе виділення ними прозапальних чинників і факторів росту (надекспресію VEGF в умовах іншого нашого дослідження також було показано раніше [26]), було причиною раннього формування мікроаневризм на внутрішній поверхні сітківки, що було виявлено у контрольній групі на 28-му добу.

У контрольній групі експресія S100 протягом експерименту збільшувалася перед усім у клітинах Мюллера – крупних відросткових нейронах внутрішнього ядерного шару та їх відростках, які радіально перетинали всі шари сітківки і чітко візуалізувалися. Розповсюдження забарвлення S100-позитивного матеріалу

на радіальні довгі відростки клітин свідчило про значне перенавантаження кальцієм та відповідало активації апоптозу сітківки [24].

Наростання інтенсивності забарвлення S100-позитивного білка у клітинах Мюллера могло пояснюватися також і моделями глутаматної ексайтотоксичності сітківки при ЦД [27]. ЦД порушує рівновагу глутамату і глутаміну між гліальними клітинами і нейронами шляхом зниження активності глутамінсинтази в клітинах Мюллера, що перешкоджає здатності цих клітин перетворювати надлишок глутамату в глутамін, а, з іншого боку, – порушує процес окиснення глутамату до α -кетоглутарату, що призводить до позаклітинного накопичення глутамату. Для підтримки позаклітинної концентрації глутамату нижче нейротоксичного рівня необхідні транспортери, основним і домінуючим з яких є переносник глутамату-аспартату (GLAST), який експресується клітинами Мюллера, на які припадає не менше 50% поглинання глутамату в сітківці ссавців [28].

Окремо можна зазначити зникнення при розвитку ДР численних поліморфних S100-позитивних клітин внутрішнього ядерного шару. Визначено, що при ЦД спостерігається осередкова дегенерація амакринових клітин із зниженням їх оптокінетичної відповіді [29]. У наших попередніх дослідженнях показана активація апоптозу клітин цього шару сітківки [30]. Отже зниження активності, а можливо, й загибель цих клітин відбувалася вже на ранніх стадіях експериментальної ДР.

Посилення імунореактивності глутаматних NMDA-рецепторів спостерігалось в гангліозних, амакринових і біполярних клітинах, а також у внутрішньому і зовнішньому плексиформних шарах сітківки при експериментальному стрептозотоциновому діабеті у щурів [31]. Це відбувалося одночасно з посиленням імунореактивності білків, що зв'язують кальцій (кальбіндину та парвальбуміну).

З таких міркувань можна пояснити активацію експресії S100 у вигляді облямівки на межі зовнішнього ядерного шару і шару паличок і колбочок, що належала клітинам пігментного епітелію, які подовжувалися у зовнішній ядерний шар. Активація експресії S100 у клітинах пігментного епітелію могла відображати компенсаторну реакцію при накопиченні кальцію у фоторецепторах.

У даному дослідженні показано, що відновлення ГАМК-ергічної медіації стану S100-позитивної глії через застосування агоніста бензодіазепінових рецепторів карбацетаму є можливим напрямком патогенетичної корекції діабетичної нейрональної дисфункції. Застосування інсуліну і карбацетаму значно послаблювало експресію S100 у клітинах внутрішнього ядерного шару та радіальних відростках клітин Мюллера.

Найбільшою мірою протективний ефект карбацетаму проявився через 28 діб, коли забарвлення до 2 балів спостерігалось у поодиноких клітинах Мюлле-

ра внутрішнього ядерного шару та сплетінні волокон гангліонарного шару. Вочевидь застосування карбацетаму запобігало розвитку патогенетичних механізмів нейродегенерації при ДР. Доказове значення має відсутність аневризми внутрішніх шарів сітківки у тварин цієї групи. Ці дані суттєвою мірою доповнювали ті, що були отримані нами раніше [24, 26], висвітлювали значення S100-позитивної глії та показували позитивний ефект застосування карбацетаму.

Застосування аналогів ГАМК вже має визнання як шлях запобігання діабетичній невропатії – препарат прегабалін отримав схвалення Управління з контролю якості харчових продуктів та лікарських засобів США (FDA) [32]. При експериментальному діабеті прегабалін посилював ГАМК-ергічну регуляцію, запобігав нейрозапаленню у сітківці, зменшував апоптоз і окисний стрес. Аналогічні властивості у наших дослідженнях мав карбацетам. Отже, відновлення ГАМК-ергічної медіації стану S100-позитивної глії є обґрунтованим напрямком патогенетичного лікування діабетичної нейроанальної дисфункції сітківки.

Таким чином, було встановлено, що при розвитку ранніх стадій ДР за умов стрептозототин-індукованого діабету інтенсивність забарвлення білка S100 у клітинах Мюллера сітківки значно зростала, чітко візуалізувалися їх довгі радіальні відростки. На 28-у добу експерименту у внутрішніх шарах сітківки виявлялися мікроаневризми, з якими щільно контактували інтенсивно забарвлені S100-позитивні волокна. Лікування тварин інсуліном приводило до послаблення інтенсивності забарвлення білка S100, тоді як комбіноване введення інсуліну і карбацетаму гальмувало експресію білка S100 і запобігало утворенню мікроаневризми сітківки.

Література

- Solomon SD, Chew E, Duh EJ, Sobrin L, Sun JK, VanderBeek BL, et al. Diabetic Retinopathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2017 Mar;40(3):412-418.
- Wong TY, Sabanayagam C. Strategies to Tackle the Global Burden of Diabetic Retinopathy: From Epidemiology to Artificial Intelligence. *Ophthalmologica*. 2020;243(1):9-20.
- Duh EJ, Sun JK, Stitt AW. Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies. *JCI Insight*. 2017 Jul 20;2(14):e93751.
- Ren J, Zhang S, Pan Y, Jin M, Li J, Luo Y, et al. Diabetic retinopathy: Involved cells, biomarkers, and treatments. *Front Pharmacol*. 2022 Aug 9;13:953691.
- 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):519-527.
- Ou GY, Lin WW, Zhao WJ. Neuregulins in Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci*. 2021 Apr 9;13:662474.
- Van de Kreeke JA, Darma S, Chan Pin Yin JMPL, Tan HS, Abramoff MD, et al. The spatial relation of diabetic retinal neurodegeneration with diabetic retinopathy. *PLoS One*. 2020 Apr 16;15(4):e0231552.
- Eggers ED. Visual Dysfunction in Diabetes. *Annu Rev Vis Sci*. 2023 May 10. .
- Fang W, Huang X, Wu K, Zong Y, Yu J, Xu H, et al. Activation of the GABA-alpha receptor by berberine rescues retinal ganglion cells to attenuate experimental diabetic retinopathy. *Front Mol Neurosci*. 2022 Aug 9;15:930599.
- Sawant A, Ebbinghaus BN, Bleckert A, Gamlin C, Yu WQ, Berson D, et al. Organization and emergence of a mixed GABA-glycine retinal circuit that provides inhibition to mouse ON-sustained alpha retinal ganglion cells. *Cell Rep*. 2021 Mar 16;34(11):108858.
- Okumichi H, Mizukami M, Kiuchi Y, Kanamoto T. GABA A receptors are associated with retinal ganglion cell death induced by oxidative stress. *Exp Eye Res*. 2008 May;86(5):727-33.
- Aragona M, Briglia M, Porcino C, Mhalhel K, Cometa M, Germanà PG, et al. Localization of Calretinin, Parvalbumin, and S100 Protein in Nothobranchius guentheri Retina: A Suitable Model for the Retina Aging. *Life (Basel)*. 2023 Oct 13;13(10):2050.
- Lim RR, Vaidya T, Gadde SG, Yadav NK, Sethu S, Hainsworth DP, et al. Correlation between systemic S100A8 and S100A9 levels and severity of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr*. 2019 Mar-Apr;13(2):1581-1589.
- Al-Kuraisy HM, Al-Gareeb AI, Saad HM, Batiha GE. Benzodiazepines in Alzheimer's disease: beneficial or detrimental effects. *Inflammopharmacology*. 2023 Feb;31(1):221-230.
- Kmet OG, Ziablitsev SV, Filipets ND, Kmet TI, Slobodian XV. Carbacetam effect on behavioral reactions in experimental Alzheimer's disease. *Archives of the Balkan Medical Union*. 2019 March; 54(1):124-129.
- 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. *International Journal of Endocrinology*. 2019;15(5):376-380. doi: 10.22141/2224-0721.15.5.2019.180040. in Ukrainian.
- Kresyun NV, Son GA, Godlevskii LS. To mechanisms of retinopathy development in streptozotocin-induced diabetes against electrical stimulation of brain structures. *J.ophthalmol.(Ukraine)*.2017;4:51-54.
- Dabbs D. Diagnostic Immunohistochemistry, 4th Edition Theranostic and genomic applications. 2014. 960 p.
- Lynch SK, Abramoff MD. Diabetic retinopathy is a neurodegenerative disorder. *Vision Res*. 2017 Oct;139:101-107.
- Simó R, Stitt AW, Gardner TW. Neurodegeneration in diabetic retinopathy: does it really matter? *Diabetologia*. 2018 Sep;61(9):1902-1912.
- Celikbilek A, Akyol L, Sabah S, Tanik N, Adam M, Celikbilek M, et al. S100B as a glial cell marker in diabetic peripheral neuropathy. *Neurosci Lett*. 2014 Jan 13;558:53-7.
- Rübsam A, Parikh S, Fort PE. Role of Inflammation in Diabetic Retinopathy. *Int J Mol Sci*. 2018 Mar 22;19(4):942.
- Cheung AK, Fung MK, Lo AC, Lam TT, So KF, Chung SS, et al. 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.

24. **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.
25. **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):271-286.
26. **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):20-29.
27. **Bogdanov P, Corraliza L, Villena JA, Carvalho AR, Garcia-Arumí J, Ramos D, et al.** The db/db mouse: a useful model for the study of diabetic retinal neurodegeneration. *PLoS One.* 2014 May 16;9(5):e97302.
28. **Sarthy VP, Pignataro L, Pannicke T, Weick M, Reichenbach A, et al.** Glutamate transport by retinal Muller cells in glutamate/aspartate transporter-knockout mice. *Glia.* 2005 Jan 15;49(2):184-96.
29. **Midena E, Torresin T, Longhin E, Midena G, Pilotto E, Frizziero L.** Early Microvascular and Oscillatory Potentials Changes in Human Diabetic Retina: Amacrine Cells and the Intraretinal Neurovascular Crosstalk. *J Clin Med.* 2021 Sep 7;10(18):4035.
30. **Ziablitzev SV, Vodianyuk VV.** Retinal apoptosis and the effect of tyrosine kinase inhibition in experimental diabetes. *Journal of Ophthalmology (Ukraine).* 2023;5(514):34-40.
31. **Ng YK, Zeng XX, Ling EA.** Expression of glutamate receptors and calcium-binding proteins in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain Res.* 2004 Aug 20;1018(1):66-72.
32. **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.

Відомості про авторів та розкриття інформації

Автор листування: Зяблицев Сергій Володимирович – zsv1965@gmail.com

Внесок кожного автора в роботу: Зяблицев С.В. – розробка концепції, проектування, аналіз та інтерпретація даних, підготовка рукопису, написання, рецензування; Жупан Д.Б. – розробка концепції, проектування, проведення досліджень і збір даних, підготовка рукопису, написання, рецензування. Усі автори проаналізували результати та схвалили остаточний варіант рукопису.

Відмови від відповідальності: висловлені у поданій статті думки є власними думками авторів, а не офіційними позиціями установи.

Джерела підтримки: відсутні.

Конфлікт інтересів. Автори засвідчують про відсутність конфліктів інтересів, які б могли вплинути на їх думку стосовно предмету чи матеріалів, описаних та обговорених в даному рукопису.

Надійшла 05.02.2024