

Вміст нейротрофічного фактору мозку BDNF в сітківці щурів з індукованим діабетом і осьовою міопією, взаємозв'язок зі структурою нейрональних елементів сітківки

І. М. Михейцева, д-р біол. наук; А. Амаїєд, аспірант; О.В. Артьомов, канд. мед. наук;
С. Г. Коломійчук, науков. співроб., М.К. Кузнєцов, лаборант

ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України»

Одеса (Україна)

Актуальність. Міопія значно зменшує частоту формування і важкість ступеню діабетичної ретинопатії (ДР). Відомо, що у хворих на діабет з міопією вкрай рідко розвивається проліферативна форма цього діабетичного ускладнення на сітківці. Але механізми цього явища залишаються невідомими. Їх вивчення з уточненням особливостей структурних змін в нейронах сітківки на моделях діабету з міопією є актуальною проблемою, яка спрямована на вивчення патогенезу і подальшого формування напрямків терапевтичного та профілактичного впливу в цих патологічних умовах.

Мета – вивчення змін рівню нейротрофічного фактору мозку BDNF в сітківці та його взаємозв'язок зі структурою нейрональних елементів сітківки у щурів з моделлю діабету і осьової міопії.

Матеріал та методи. Експеримент проводили на щурах віком від 2 до 10 тижнів, які поділяли на 4 групи: 1- з міопією; 2 - з діабетом; 3 - з міопією і діабетом; 4 - контрольна (здорові тварини). Двотижневим щурам моделювали осьову міопію блефарорафією обох очей. Діабет моделювали 5-кратним внутрішньоочеревинним введенням субдіабетичних доз стрептозотоцину (15,0 мг/кг маси). Діабет індукували в 3-й групі після моделювання міопії та у інтактних у щурів. Через 2 місяці всіх тварин виводили з експерименту під наркозом і енуклеювали очі. Були проведені гістоморфологічні дослідження, зрізи забарвлювались гематоксилін-еозином і вивчались на світловому мікроскопі Jenamed-2 з фото-реєстрацією. Вміст BDNF визначали в супернатантах сітківки та плазмі крові тварин методом ІФА, застосовуючи набір «Rat BDNF, ELISA Kit» (Elabscience, USA).

Результати. Встановили, що в групі з діабетичними змінами на сітківці, які супроводжувались міопізацією очного яблука, зниження рівня BDNF в плазмі крові і особливо в тканині сітчастої оболонки, було значно менш виражено. Так в сітківці рівень цього показника був на 36,1% вище ніж в групі діабет без міопії. У групі з діабетом на тлі експериментальної міопії виявлено, на відміну від групи тільки з діабетом, досить високу щільність нейронів в шарі гангліозних клітин сітчастої оболонки. У шарі біполярних нейронів та шарі фоторецепторів помітної зміни щільності клітин не зазначено.

Висновок. Подовження осі очного яблука внаслідок міопії у експериментальних тварин сприяє протекції діабетичних змін в сітківці, що підтверджено на молекулярному та морфологічному рівні, ймовірною ланкою цього захисного механізму є нейротрофічний фактор мозку BDNF.

Ключові слова:

діабетична ретинопатія, міопія, щури, сітківка, BDNF, нейрональні елементи сітчастої оболонки, структурні зміни, гангліозні клітини

Вступ. Незважаючи на численні дослідження, що проводяться в усьому світі з проблеми вивчення патогенезу та методів лікування такого важкого захворювання як діабетична ретинопатія, на сьогоднішній день залишається багато відкритих питань.

Формування та розвиток діабетичної ретинопатії (ДР) в умовах міопізації очного яблука, а саме подовження його сагітальної осі, супроводжується особливостями клінічної картини ретинопатії. З клінічних спостережень відомо, що при міопії, особливо міопії високого ступеня, частота виникнення діабетичних змін в сітківці, а також швидкість прогресування ретинопатії можуть бути знижені. Кількість публікацій

стосовно зниження ризику розвитку ДР у пацієнтів з міопією неухильно зростає [1-5].

В даний час механізм захисної дії міопії при діабетичній ретинопатії не зрозумілий, ще не вивчений зв'язок із структурними змінами ока і його компонентів. Різні метаболічні чинники патогенезу діабетичної ретинопатії та міопії вивчаються протягом останнього часу, але особливості патогенетичних механізмів діабетичних змін в сітківці і хоріоїдеї при міопії високого ступеню ще достатньо не досліджені.

Встановлено, що подовження аксіальної довжини очного яблука має рішуче значення у протекторному ефекті міопії у пацієнтів з цукровим діабетом (ЦД) щодо розвитку або поглибленню ДР. Цей висновок було зроблено на основі мета-аналізу [3]. Нашими попередніми експериментальними роботами на моделях захворювання також було доведено це ствердження [6].

Нейротрофічний фактор мозку (BDNF), який взаємодіє з тропоміозин- зв'язаною кіназою В (TrkB), сприяє росту, диференціюванню нейронів, вивільненню нейротрансмітерів та синаптичній пластичності. BDNF відіграє життєво важливу роль у зростанні нейронів, регуляції їхнього виживання. На сьогоднішній день доведена важлива нейропротекторна роль BDNF в захисті нейронів від ішемічного пошкодження [7]. Цей нейротрофін також утворюється в гангліозних клітинах сітківки. При ДР шар цих клітин сітківки ушкоджується. Тому цілком ймовірна істотна роль цього пептиду у патогенезі ДР [8].

За результатами дослідження, яке проводилося японськими вченими у 2001 р., у міопів значимо не змінюється рівень нейротрофічних факторів (NT-3, NGF, BDNF) [9], що, можливо, говорить про відсутність запрограмованої загибелі клітин (апоптозу) при короткозорості.

Метою цієї роботи було вивчення змін рівню нейротрофічного фактору мозку BDNF в сітківці та його взаємозв'язку зі структурою нейрональних елементів сітківки у щурів з моделлю діабету і осьовою міопією.

Матеріал та методи

Дослідження були проведені згідно до вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших цілей» (Страсбург, 1986), «Правил виконання робіт з використанням експериментальних тварин», затверджених наказом МОЗ України та законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 1759-VI від 15.12.2009) та рішенням локального комітету з біоетики (від 09.2021). Експеримент проводили на щурах віком від 2 до 10 тижнів, які поділяли на 4 групи: 1- з міопією (n=15); 2 - з діабетом (n=15); 3 - з міопією і діабетом (n=15); 4 - контрольна (здорові тварини, n=10). Двотижневим щурам моделювали осьову міопію високого ступеня шляхом блефарорафії обох очей і знаходженням в умовах зниженого освітлення протягом 2 тижнів [10]. З метою моделювання діабету, враховуючи вік щурів, тварини отримували 5-кратне внутрішньочеревинне введення субдіабетичних доз стрептозотоцину (15,0 мг/кг маси, сумарно 75,0 мг/кг). Тварини контрольної групи утримувалися в звичайних умовах віварію (щодо освітлення та харчування). Діабет індукували в 3-й групі після моделювання міопії (через 3 тижні з початку експерименту), а також у інтактних щурів. Через 2 місяці всіх тварин виводили з експерименту під наркозом і енуклеювали очі.

Були проведені гістоморфологічні дослідження в тканинах очей щурів з міопією, стрептозотоциновим діабетом та міопією при діабеті. Очі фіксувалися в нейтральному 10% розчині формаліну і надалі оброблялися за стандартною гістологічною методикою з отриманням парафінових блоків. Серійні зрізи забарвлювалися гематоксилін-еозином і вивчалися на світловому мікроскопі з фото-реєстрацією. Оцінка морфологічних змін проводилася на мікроскопі Jenamed-2 при малому і великих збільшеннях: 100x, 200x і 400x.

Вміст BDNF визначали в супернатантах сітківки та плазмі крові експериментальних тварин імуноферментним методом, застосовуючи набір «Rat BDNF, ELISA Kit» (Elabscience, USA) згідно з протоколом виробника, а вміст загального білка по методу Лоурі. Гомогенат сітківки готували, використовуючи ультразвукову обробку в 50 mM трис-HCl буфері (pH 7,5) з інгібіторами протеаз, з подальшим центрифугуванням протягом 15 хв при 12000g при 4°C та отриманням супернатанту сітківки. Результати виражали як концентрацію BDNF (пг/мг білка).

Для статистичного аналізу біохімічних даних застосовували програмне забезпечення Statistica. Аналізували середні дані та їх стандартні похибки, вірогідними вважали значення при P<0,05.

Результати

Отримані дані вмісту рівня BDNF як в плазмі крові, так і в сітківці щурів з міопією вірогідно не відрізнялись від відповідних даних контрольної групи, що узгоджується з даними японських дослідників [9].

В наших дослідженнях ми також визначали рівень BDNF в крові та в сітківці щурів в експериментальних групах з діабетом та діабетом з міопією (табл. 1).

Таблиця 1. Вміст BDNF в сітківці і плазмі крові (в пг/мг білка) щурів при деприваційній міопії і стрептозотоциновому діабеті

Статистичні показники	Контроль (n = 10)	Діабет (n = 15)	Міопія + діабет (n = 15)
Плазма крові			
M±m	5,24±0,35	3,76±0,24	4,29±0,32
%	100,0	71,8	81,9
p	-	<0,05	<0,05
%1	-	100	114,0
p1	-	-	>0,05
Сітківка			
M±m	23,78±1,96	14,83±1,24	20,19±1,73
%	100,0	62,4	84,9
p	-	<0,01	>0,05
%1	-	100,0	136,1
p1	-	-	<0,01

Примітки: n – кількість тварин; p – рівень вірогідності відмінностей даних по відношенню до контрольної групи; p₁ – рівень вірогідності відмінностей даних по відношенню до групи тварин с діабетом.

Оцінюючи дані змін BDNF у експериментальних тварин, можна констатувати наявність таких змін в обох експериментальних групах, але ступінь змін в них була різним. Так в тканині сітківки шурів з діабетом відмічене суттєве зниження вмісту BDNF на 37,6% відносно контролю, в крові вміст цього мозкового фактору був знижений на 28,2% ($p < 0,05$).

Тоді як в групі тварин з діабетом та міопією рівень BDNF в крові та сітківці знижувався менш виражено. Так в порівнянні з контрольною групою вміст цього показника був знижений в плазмі крові на 18,1% ($p < 0,05$), в сітківці – на 15,1% ($p > 0,05$). Порівнюючи дані вмісту BDNF цих двох експериментальних груп отримали наступні результати. В групі з міопією і діабетом цей показник відрізнявся від відповідних даних групи тварин тільки з діабетом таким чином: в плазмі крові він мав тенденцію до підвищення на 14,0% ($p > 0,05$), а в сітківці рівень цього показника був на 36,1% вище ($p < 0,01$).

Таким чином, результати експериментального дослідження встановили, що в групі з діабетичними змінами на сітківці, які супроводжувались міопізацією очного яблука, зниження рівня нейротрофічного фактору мозку, в плазмі крові і особливо в тканині сітчастій оболонки, було значно менш виражено, ніж в групі без міопії. Можна вважати, що в групі поєднанного моделювання BDNF міг діяти більшою мірою в якості нейропротекторного фактору та чинити захисний вплив на сітківку.

Морфологічний стан нейрональних елементів сітківки

Наступним етапом дослідження було вивчення структурного стану сітківки під впливом моделювання діабету, осьової міопії та діабету на тлі міопії. Результати гісто-морфологічного дослідження свідчили, що стан нейрональних елементів сітківки в цих групах суттєво відрізнявся (рис. 1-4).

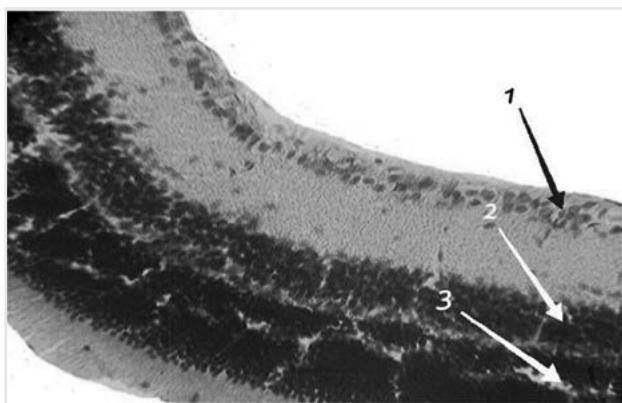


Рис. 1. Гістопрепарат сітківки контрольного щура. Збільшення 200х. 1 – шар гангліозних клітин; 2 – внутрішній ядерний шар; 3 – шар фоторецепторних клітин.

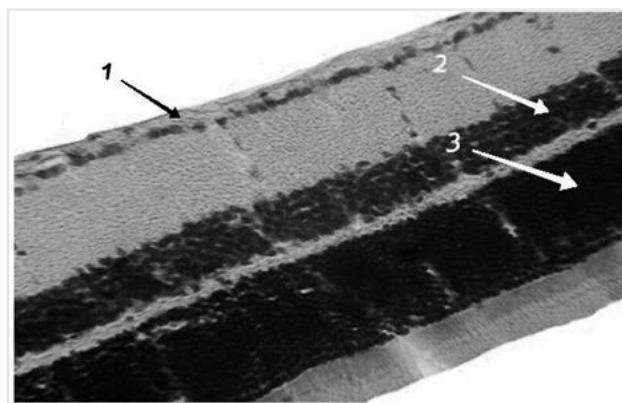


Рис. 2. Гістопрепарат сітківки щура з осьовою міопією. Збільшення 200х. 1 – шар гангліозних клітин; 2 – внутрішній ядерний шар; 3 – шар фоторецепторних клітин.

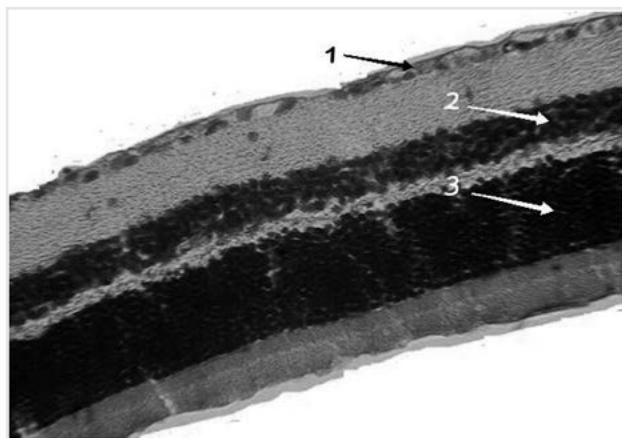


Рис. 3. Гістопрепарат сітківки щура зі стрептозотозинним діабетом. Збільшення 200х. 1 – шар гангліозних клітин; 2 – внутрішній ядерний шар; 3 – шар фоторецепторних клітин.

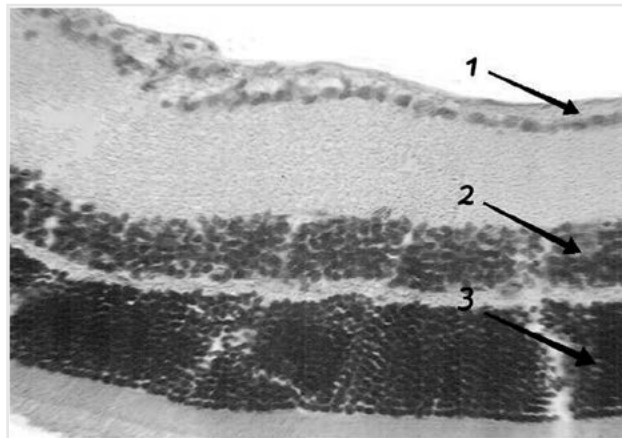


Рис. 4. Гістопрепарат сітківки щура зі стрептозотозинним діабетом на тлі осьової міопії. Збільшення 200х. 1 – шар гангліозних клітин; 2 – внутрішній ядерний шар; 3 – шар фоторецепторних клітин

При гістологічному дослідженні в сітківці контрольних щурів (рис. 1) відзначається висока щільність гангліозних клітин (ГК) (від 20 до 25 клітин у полі зору) при великому збільшенні (200х).

Внутрішній ядерний шар і шар фоторецепторів характеризуються великою щільністю клітин. Оцінюючи морфологічний стан нейронального апарату сітківки за даними гістопрепаратів встановлена різна ступень порушень в трьох експериментальних групах. Так, в сітківці щурів групи з осьовою міопією (рис. 2) щільність нейронів гангліозного шару місцями наближалась до контрольної групи, але в цілому була декілька нижче (в межах від 15 до 20 клітин у полі зору). У внутрішньому ядерному шарі та шарі фоторецепторних клітин змін щільності нейронів не відзначено.

У групі з експериментальним діабетом (рис. 3) гістологічна картина сітчастої оболонки характеризувалась нерівномірною щільністю нейронів гангліозного шару, місцями з наявністю ділянок випадіння ГК. При цьому щільність ГК в окремих ділянках становила менше 10 (оцінка проводилась при великому збільшенні). У внутрішньому ядерному шарі та шарі фоторецепторів помітної зміни щільності клітин не зазначено.

У групі зі стрептозотациновим діабетом на тлі експериментальної міопії (рис. 4) виявлено, на відміну від групи з діабетом, досить високу щільність нейронів в шарі гангліозних клітин сітчастої оболонки, яка місцями досягала 20 клітин. У внутрішньому ядерному шарі та шарі фоторецепторів помітної зміни щільності клітин не зазначено.

Обговорення

Зіставляючи результати біохімічних та морфологічних досліджень, встановлено, що в групі тварин з найнижчим рівнем нейротрофічного фактору мозку BDNF як в сітківці, так і в крові, а це група з діабетом, ми спостерігали найбільші зміни в нейрональній структурі сітківки. В цій групі з діабетом щільність ГК в очах щурів була найменшою. Слід врахувати, що саме порушення в шарі ГК є основною патологічною ознакою нейродегенерації сітківки, спричиною ЦД, та розвитку діабетичної ретинопатії [11, 12].

Виявлені гістоморфологічні та біохімічні зміни в сітківці у щурів з експериментальною міопією і стрептозотациновим цукровим діабетом певною мірою підтверджують концепцію про те, що міопізовані очі з подовженою сагітальною віссю мають здатність «протистояти» розвитку проявам важкої діабетичної ретинопатії.

Модель цукрового діабету, яку індукують введенням стрептозотацину (СТ) було запропоновано Rakieta та співавт. у 1963 році. З того часу вона широко використовується в наукових дослідженнях. Стіжка гіперглікемія, поліурія, полідипсія характерні для ЦД, відтворюються в цій моделі у тварин (щери, собаки, рідше кролики). СТ викликає порушення в островках

Лангергансу і втрату β -клітин [13]. Механізмом дії СТ є клітинна загибель шляхом дефрагментації молекули ДНК. Початок ураження сітківки у щурів при СТ моделі діабету спостерігається біля 2 тижнів після індукування діабету порушенням гематоретинального бар'єру. Зовнішній ядерний шар витончується за 4 тижні після індукації діабету, що формує вже ознаки діабетичної ретинопатії [14, 15]. В нашому експерименті ми вивчали структурні зміни, як і стан нейротрофічного фактору в сітківці, саме на таких строках моделювання діабету (через 4 – 5 тижнів).

По даним Guo M. та співавт. [16] зниження вмісту BDNF у сироватці крові пацієнтів з ЦД 2 було пов'язане з ДР, а при більш загрозливих для зору формах ретинопатії відмічене найбільш суттєве зниження BDNF. Багатомірний аналіз логістичної регресії, скоригований з урахуванням загальних факторів ризику, показав, що рівні BDNF в системі є незалежними факторами ризику для ДР. Автори вважають, що цей фактор відіграє суттєву роль у патогенезі ускладнень ДР.

В роботі Ola M.S. [17] та співавт. підкреслено, що автори спостерігали зниження рівня нейротрофічного фактору мозку як у пацієнтів з ДР (у сироватці крові), так і у щурів з моделлю діабету в сітківці. Робляться висновки, що зниження рівня BDNF при діабеті може викликати на сітківці апоптоз та нейродегенерацію і привести до розвитку нейро-судинних пошкоджень і формуванню ретинопатії.

Заключення. Нашими дослідженнями було встановлено, що моделювання діабету у щурів супроводжувалось зниженням рівня нейротрофічного фактору мозку BDNF у сітківці та крові. Ці метаболічні зміни супроводжувались структурними змінами нейронів сітківки, ознаки яких притаманні діабетичній ретинопатії (зменшення кількості гангліозних клітин). Моделювання же діабету у щурів з первинно індукованою осьовою міопією характеризувалось значно меншими змінами рівня BDNF (місцевого і системного), а також супроводжувалось суттєво покращеною морфологічною картиною нейронального апарату сітківки. При цьому гістологічні дослідження вказують на відносно збереження щільності клітин гангліозного шару при експериментальному діабеті на тлі міопії, що може служити структурним еквівалентом більш високого зберігання функції сітківки при даному стані в порівнянні з іншими експериментальними нозоформами, що спостерігалися нами. У внутрішньому ядерному шарі нейронів та шарі фоторецепторів помітних структурних змін і щільності клітин не зазначено.

Таким чином, подовження осі очного яблука внаслідок міопії у експериментальних тварин сприяє протекції діабетичних змін в сітківці, що підтверджено на молекулярному та морфологічному рівні, ймовірно ланкою цього захисного механізму є нейротрофічний фактор мозку BDNF.

Література

1. **Lim LS, Lamoureux E, Saw SM, Tay WT, Mitchell P, Wong TY.** Are myopic eyes less likely to have diabetic retinopathy? *Ophthalmology*. 2010;117(3):524–30.
2. **Man RE, Sasongko MB, Sanmugasundram S, et al.** Longer axial length is protective of diabetic retinopathy and macular edema. *Ophthalmology*. 2012;119(9):1754–9.
3. **Wang Q, Wang YX, Wu SL, et al.** Ocular Axial Length and Diabetic Retinopathy: The Kailuan Eye Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2019; 60(10):3689–95.
4. **Lin Z, Li D, Zhai G, et al.** High myopia is protective against diabetic retinopathy via thinning retinal vein: A report from Fushun Diabetic Retinopathy Cohort Study (FS-DIRECT). *Diab Vasc Dis Res* Jul-Aug. 2020;17(4):1479164120940988.
5. **Weijung Ten, Ying Yuan, Wei Zhang, Yue Wu & Bilian Ke.** High myopia is protective against diabetic retinopathy in the participants of the National Health and Nutrition Examination Survey *BMC. Ophthalmology* 2023; 23:468.
6. **Михейцева ІМ, Молчанюк НІ, Амаїєд Ахмед, Коломійчук СГ, Сіроштаненко ТІ.** Особливості ультраструктурних змін у нейросенсорних елементах сітківки щурів при моделюванні діабетичної ретинопатії на тлі осьової міопії. *Фізіол журн*. 2024; 1:31-36.
7. **Tuwar MN, Wei-Hung Chen, Chiwaya AM et al.** Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and translocator protein (TSPO) as diagnostic biomarkers for acute ischemic stroke. *Diagnostics*. 2023; 13(13): 2298.
8. **Yun-Zheng Le, Bei Xu, Ana J Chucair-Elliott et al.** VEGF Mediates Retinal Müller Cell Viability and Neuroprotection through BDNF in Diabetes. *Biomolecules*. 2021;11(5):712.
9. **Akamatsu S, Fujii S, Escañó MF** Altered expression of genes in experimentally induced myopic chick eyes. *Jap. J. Ophthalmology*. 2001, 45 (2), 137-143.
10. **Mikheytsva IN, Abdulhadi Mohammad, Putienko AA, et al.** Modelling form deprivation myopia in experiment. *Journal of Ophthalmol*. 2018; 2 (481):50-55.
11. **Simo R, Stitt AW, Gardner TW.** Neurodegeneration in diabetic retinopathy: does it really matter? *Diabetologia*. 2018; 61 (9): 1902-1912.
12. **Duh EJ, Sun JK, Stitt AW.** Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies *JCI Insight*. 2017; 2: (14).
13. **Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV.** Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep*. 1963;29:91–98.
14. **Rungger-Brändle E, Dosso AA, Leuenberger PM.** Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci Assoc Res Vis Ophthalmol*. 2000; 41(7):1971–1980.
15. **Olivares AM, Althoff K, Chen GF et al.** Animal Models of Diabetic Retinopathy. *Curr Diab Rep*. 2017; 17: 93.
16. **Guo M, Liu H, Li SS et al.** Low serum brain-derived neurotrophic factor but not brain-derived neurotrophic factor gene val66met polymorphism is associated with diabetic retinopathy in Chinese type 2 diabetic patients *Retina*. 2017; 37(2):350-358.
17. **Ola MS, Nawaz MI, El-Asrar AA et al** Reduced levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF) in the serum of diabetic retinopathy patients and in the retina of diabetic rats. *Cell Mol Neurobiol*. 2013;33(3):359-67.

Відомості про авторів та розкриття інформації

Автор листування: Коломійчук Сергій Григорович – filatovbiochem@ukr.net

Внесок кожного автора в роботу: Михейцева І. – розроблення концепції, методології, редагування статті; Амаїєд А. – проведення досліджень, аналіз та інтерпретація даних, написання статей; Артёмов О. – проведення досліджень, аналіз та інтерпретація даних, написання статей; Коломійчук С. – аналіз та інтерпретація даних, написання статті; Кузнецов М. – проведення досліджень, збір даних. 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 04.03.2023