

Експериментальні дослідження

УДК 616.37-008.64-092:001.892.57

Апоптоз клітин сітківки та вплив блокади тирозинових протеїніназ при експериментальному цукровому діабеті

С. В. Зяблицев, д-р мед. наук, професор, В. В. Водяник, аспірант, лікар-офтальмолог

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

Актуальність. Постійна гіперглікемія за умов цукрового діабету (ЦД) веде до активації низки патохімічних каскадів, що викликаючи гліальну, нервову та мікросудинну дисфункцію, може запускати апоптоз клітин сітківки. Вивчення процесів апоптозу при діабетичній ретинопатії (ДР) та розуміння можливості керування цим процесом є перспективним напрямком лікування ДР.

Мета дослідження – вивчити клітин сітківки з оцінкою тканинної експресії каспази-3 та вмісту у сітківці протеїнів Вах і Bcl-xl при експериментальному ЦД та встановити ефект блокатора тирозинових протеїніназ іматинібу.

Матеріал та методи. У 45 трьохмісячних щурів-самців лінії Wistar моделювали ЦД шляхом одноразового введення стрептозотозину (50 мг/кг; Sigma-Aldrich, Co, China). Щурів було розподілено на 3 групи: контрольна, з введенням інсуліну (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark) і з введенням інсуліну і іматинібу (Grindeks, Latvia). Імуногістохімічно у сітківці виявляли каспазу-3 (Monoclonal Antibody; ThermoFisher Scientific, USA), методом імуноблотингу – вміст Вах і Bcl-xl.

Результати. Стійка гіперглікемія, що розвивалася після введенні стрептозотозину, супроводжувалася розвитком ранніх морфологічних проявів ДР: дегенеративних змін нервових клітин та їх відростків, набряку та ішемії шарів сітківки. Введення інсуліну гальмувало, а комбіноване введення інсуліну і іматинібу запобігало розвитку ДР. В процесі спостереження у сітківці наростала експресія каспази-3 (особливо у гангліонарних і мюллерових клітинах), яка гальмувалася інсуліном і зникала при застосуванні інсуліну з іматинібом. За даними імуноблотингу у тканинах сітківки багаторазово збільшувався вміст протеїнів Вах, що гальмувалося інсуліном, і у більшому ступені – інсуліну з іматинібом. Іматиніб індукував накопичення у сітківці протеїну Вах-xl.

Висновок. Розвиток ДР та активація апоптозу клітин сітківки при експериментальному ЦД у щурів суттєво гальмувалися при додаванні до введення інсуліну блокатора тирозинових протеїніназ іматинібу.

Ключові слова:

діабетична ретинопатія,
імуногістохімія, імуноблотинг, стреп-
тозотозин, іматиніб, каспаза-3, Вах,
Bcl-xl, апоптоз, сітківка

Вступ. Одним із найчастіших мікросудинних ускладнень цукрового діабету (ЦД) є діабетична ретинопатія (ДР), що вражає майже третину пацієнтів і є однією з причин сліпоти серед дорослого працездатного населення [1]. У 2021 р. глобальна поширеність ДР оцінювалася в 10,5% (536,6 млн. осіб) і, як очікується, збільшиться до 12,2% (783,2 млн. осіб) у 2045 р. [2].

Постійна гіперглікемія веде до надмірного виробництва мітохондріями активних форм кисню та посилення патохімічних каскадів по чотирьох шляхах: протеїніназному, поліоловому, гексозаміновому, кінцевих продуктів посиленого глікування, що, у свою чергу, індукує запалення, сприяє гіперпродукції факторів транскрипції і порушенню експресії генів [3]. Наростаючий каскад патологічних процесів викликає

гліальну, нервову та мікросудинну дисфункцію, гіпертрофію, проліферацію, ремоделювання та апоптоз [4].

Центральне місце в реалізації апоптозу займає клас цистеїн-аспартат-специфічних протеаз, відомих як каспази [5]. Сімейство каспаз опосередковує багато клітинних реакцій: загибель клітин, клітинне диференціювання, імунні відповіді, аксональну передачу та проліферацію. У процесі апоптозу активована каспаза-3 розщеплює широкий спектр білкових субстратів, що призводить до типових морфологічних змін в апоптотичних клітинах [6], а її виявлення є дуже надійним способом ідентифікації апоптотичних клітин, навіть до

появи морфологічних ознак, таких як фрагментація ДНК [7]. Каспаза-3 бере участь в апоптотичній загибелі гангліонарних клітин сітківки, що спричинено ішемією, ексайтотоксичністю, аксотомією та хронічною очною гіпертензією, тоді як її пригнічення зменшувало апоптотичну загибель клітин, викликану цими процесами [8].

На відміну від зовнішнього шляху, внутрішній шлях апоптозу запускається через активацію Вах-Вак-залежної проникності мітохондріальної зовнішньої мембрани, при цьому цитохром С вивільняється з мітохондрій, тим самим стимулюючи активацію каспази-9 і нижчестоящих виконавчих каспаз-3 і -7 для ініціації апоптозу [7, 9]. В протипагу проапоптотичним протеїнам Вах, протеїн Bcl-xl є фактором, що перешкоджає апоптозу [5]. У діабетичній сітківці виявлено значне пригнічення Bcl-xl [10].

Таким чином, вивчення процесів апоптозу при ДР та розуміння можливості керування цим процесом є перспективним напрямком лікування клітинного пошкодження. В цьому плані досить привабливим є пригнічення тирозинових протеїнкіназ – нового класу мембранних рецепторів, які фосфорилують білки сигнальних шляхів за гідроксильними групами тирозину [11, 12]. Цей напрямок наразі активно використовується для пригнічення механізмів злоякісної трансформації клітин, оскільки відомі на сьогодні онкогени кодують тирозинкінази.

При експериментальному ЦД у щурів було показано, що один з ключових тирозинкіназних шляхів – шлях мітоген-активованої протеїнкінази (Mitogen-activated Protein Kinase, MAPK)/позаклітинної сигналь-залежної кінази (Extracellular Signal-regulated Kinase, ERK) у судинному ендотелії був значно експресованим [13, 14]. Гальмування цього шляху антиоксидантами запобігало розвитку фенотипічних проявів діабету та, зокрема, ДР [15, 16]. Такі дані обґрунтовують можливість прямого інгібування MAPK за допомогою конформаційно-специфічних інгібіторів кінази [17].

Ефективним низькомолекулярним інгібітором протеїн-тирозинкінази, що значно пригнічує як її активність, так і клітинні процеси, що опосередковані її активацією є імаїніб [18]. Застосування біоінформаційного підходу та комплексного аналізу механізмів неоваскуляризації при ДР визначило імаїніб як новий потенційний препарат для майбутнього лікування ДР [19].

Мета дослідження – вивчити апоптоз клітин сітківки з оцінкою тканинної експресії каспази-3 та вмісту у сітківці протеїнів Вах і Bcl-xl при експериментальному ЦД та встановити ефект блокатору тирозинових протеїнкіназ імаїнібу.

Матеріал і методи

При виконанні роботи керувалися нормами та принципами Директиви 2010/63 ЄС із захисту тварин, Гельсінкської декларації (2008) та вимогами Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводжен-

ня» (№1759-VI від 15.12.2009), а також Експертним висновком комісії з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (протокол № 165 від 05.12.2022 р.). Тварин тримали в умовах віварію на стандартному раціоні.

До дослідження залучено 45 трьохмісячних щурів-самців лінії Wistar вагою 140-160 г. Експериментальний ЦД моделювали шляхом одноразового внутрішньо очеревиного введення стрептозотоцину (50 мг/кг; Sigma-Aldrich, Co, China). Кожні три доби контролювали рівень глікемії за допомогою глюкометра та одноразових тест-смужок (ACCU-Chek Instant, Roche, Mannheim, Germany) у крові, забраної з хвостової вени натще. У якості контролю введення стрептозотоцину 5 щурам вводили тільки розчинник (цитратний буфер). Через 3 доби після ін'єкції вміст глюкози у крові тварин, яким вводили стрептозотин був не менше 17 ммоль/л. В жодного з щурів, яким було введено тільки розчинник, вміст глюкози у крові не перевищував 5,7 ммоль/л протягом всього спостереження. У 4 тварин (8,9%), яким було введено стрептозотин вміст глюкози у крові не перевищував 6,7 ммоль/л, ці тварини були виключені з експерименту. У цьому дослідженні тварин спостерігали 28 діб, летальність протягом цього часу склала 13,3%.

У сечі за допомогою тест-смужок (CITOLAB, ООО «Фармаско», Вишгород, Україна) визначали вміст глюкози та кетонів.

Через 7 діб тварин зі стійкою гіперглікемією сліпим випадком розділили на 3 групи. 1-у групу (контроль) склали 10 тварин, яким лікування гіперглікемії не проводили. Цих тварин виводили з експерименту через 7 (4 особини), 14 (3 особини) та 28 (3 особини) діб шляхом смертельної ін'єкції тіопенталу (75 мг/кг) та декапітації. Також у контрольну групу було включено 5 тварин, яких для отримання початкових даних виводили з експерименту у день введення стрептозотоцину (0 діб). 2-у групу склали 7 тварин, яким через день внутрішньоочеревино вводили інсулін короткої дії (Actrapid HM Penfill, Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark) у дозі 30 Од. Тваринам 3-ї групи (8 особин) вводили інсулін (по схемі 2-ї групи), а також per os щоденно вводили розчин інгібітору протеїнкіназ імаїнібу (комерційний препарат Імаїніб Гріндекс 100 мг, Grindeks, Latvia) у дозі 20 мг/кг. Тварин 2-ї і 3-ї груп виводили з експерименту на 28-у добу.

Після ін'єкції тіопенталу та декапітації у тварин проводили двобічну енуклеацію. Для морфологічних досліджень очі занурювали у 10% розчин нейтрального формаліну (DIAPATH S.p.A., Martinengo, Italy). Обробка проводилася за загальноприйнятою гістологічною методикою. З парафінових блоків на ротаційному мікротомі HM 325 (“Thermo Shandon”, Англія) виготовляли серійні гістологічні зрізи товщиною 2–3 мкм. Для світлооптичних досліджень серійні парафінові зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозинном.

Імуногістохімічне дослідження (ІГХД) проводили з використанням моноклональних мишиних анти-тіл проти каспази-3 (Caspase 3 Monoclonal Antibody, clone74T2; ThermoFisher Scientific, USA); застосовували систему детекції Master Polymer Plus Detection (Master Diagnostica, Spain). Зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном. Мікроскопічне дослідження та фотоархівування проводили із використанням світлооптичних мікроскопів “ZEISS” (Німеччина) з системою обробки результатів “Axio Imager. A2”. Оцінку вираженості експресії проводили згідно рекомендаціям D.J. Dabbs (2014) на підставі візуально-аналогової шкали: 0 балів – забарвлення відсутнє; 1 бал (+) – слабка інтенсивність забарвлення; 2 бали (++) – середня інтенсивність забарвлення; 3 бали (+++) – виска інтенсивність забарвлення [20].

Визначення вмісту протеїнів Вах і Bcl-xl у лізатах тканини сітківки проводили методом імуноблотингу. Зразки тканини витримували у рідкому азоті, подрібнювали та гомогенізували. Електрофорез проводили у 8%-му поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS-PAGE) у камері для вертикального гелелектрофорезу (“BioRad”, США). Протеїни з гелю переносили на нітроцелюлозну мембрану за допомогою електроблоту. Мембрани інкубували з моноклональними антитілами до Вах (Sigma Aldrich, USA, no. B3428, rabbit, 1:2,000 diluted) і Bcl-xl (Sigma Aldrich, USA, SAB4502623, rabbit, 1:1,000 diluted). Антитіла до актину (β -actin (loading control), no. MA5-15739, mouse, 1:3,000, Invitrogen, USA) використовували для його детекції як контролю нанесення протеїну. Після первинної інкубації мембрани відмивали та обробляли антивидовими вторинними антитілами, кон’югованими з пероксидазою (goat anti-rabbit or anti-mouse IgG, Invitrogen, USA, 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 VEGF і HIF-1 α виражали у відношенні до контрольної величини оптичної густини відповідної поліпептидної зони (в умовних одиницях) на блотограмах, нормованої за вмістом актину в кожному зразку (VEGF/актин і HIF-1 α /актин).

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

Результати

Введення стрептозотину у щурів супроводжувалося розвитком стійкої гіперглікемії, яка в 1-й (контрольній) групі на 28 добу складала $27,6 \pm 1,0$ ммоль/л. Необхідно зазначити, що повторні (кожні три доби) вимірювання вмісту глюкози у крові контрольних щурів показували високі значення глікемії (не менше 17

ммоль/л). Стійкій гіперглікемії були супутні виражене збільшення добового споживання рідини (310 ± 16 мл/кг, в нормі – 111 ± 8 мл/кг), поліурія (добовий діурез складав 274 ± 14 мл/кг, в нормі – 84 ± 5 мл/кг), а також глюкозурія і кетонурія на рівні не менш 14 ммоль/л і $3,9$ ммоль/л, відповідно. Відмічена втрата ваги тіла зі $145,1 \pm 2,5$ г на початку дослідження до $115,3 \pm 1,6$ г на 28 добу ($p < 0,05$). Протягом спостереження 6 (13,3%) тварин цієї групи загинули. Такі дані показали адекватність застосованій моделі відтворення у щурів стійкої гіперглікемії з кетозом.

Корекція гіперглікемії у 2-й та 3-й групах приводило до зниження вмісту глюкози, який на 28 добу склав $16,8 \pm 0,7$ ммоль/л і $11,1 \pm 0,9$ ммоль/л ($p < 0,05$ у порівнянні з рівнем 1-ї групи). Відповідно й інші фенотипічні прояви ЦД були виражені у меншому ступені.

Морфологічні дослідження сітківки на 28 добу показали розвиток початкових ознак ДР у сітківці щурів 1-ї (контрольної) групи (рис. 1А – див. 2 стор. обкладинки).

Спостерігалось зниження щільності клітин у ядерних шарах сітківки, набряк всіх шарів, що особливо було помітне у внутрішньому плексіформному шарі, ділятка судин з явищами мікротромбоутворення, розповсюджені ділянки ішемії з вакуолізацією цитоплазми нервових клітин, внутрішньоклітинним набряком, пікнозом ядер. Відмічено суттєве зниження кількості гангліонарних клітин, їх вакуолізація, яка чергувалася з гіперхромією нейронів, пікноз ядер. Такі зміни свідчили про виражені дегенеративні зміни нервових клітин, що відбувалися на тлі порушень мікроциркуляції та метаболізму.

У 2-й групі діабетичні зміни сітківки були менш вираженими (рис. 1В – див. 2 стор. обкладинки), натомість зберігалися розрідження і набряк ядерних шарів, ділянки ішемії, клітини з ознаками гіпохромії та вакуолізації цитоплазми. У 3-й групі пошкодження сітківки було мінімальним (рис. 1С – див. 2 стор. обкладинки). Зберігався незначний набряк всіх шарів, повнокрів’я судинного русла.

Таким чином, протягом 28 діб стійкої гіперглікемії формувалася початкова ДР з порушеннями мікроциркуляції у вигляді набряку та ішемії, що супроводжувалося дегенерацією нервових клітин. Введення інсуліну та, більшою мірою, – комбінації інсуліну з іматинібом попереджувало розвиток ДР та зберігало нервові клітини від дегенерації.

Розвиток стану апоптозу, який було оцінено при ІГХД каспази-3 в сітківці, показав певну послідовність патологічних подій протягом спостереження у контрольній групі (рис. 2 – див. 2 стор. обкладинки). На початку дослідження (рис. 2А) експресія каспази-3 була виражена слабкою мірою у радіальних відростках нервових клітин (за морфологію схожих на клітини Мюллера) і дрібних клітинах (ймовірно, астроцитах) у шарі гангліонарних клітин. Інтенсивність забарвлення не перевищувала 1 балу за шкалою D.J. Dabbs [20].

На 7 добу експресія каспази-3 суттєво посилювалася (рис. 2В – див. 2 стор. обкладинки). Довгі відростки клітин, в яких імунопозитивне забарвлення виявлялося вздовж всього волокна, діаметрально перехрещували сітківку, що відповідало характерній будові клітин Мюллера. Кількість позитивно забарвлених дрібних клітин у шарі гангліонарних клітин збільшувалася. Крім того, самі гангліонарні клітини мали імунопозитивні включення у вигляді невеликих глибок по периферії цитоплазми, також позитивно забарвлювалися їх аксони, що мали горизонтальний напрямок. Інтенсивність забарвлення цих структурних елементів сітківки за шкалою D.J. Dabbs складала 2-3 бала. Слабке забарвлення на цей термін виявлялося у внутрішньому сегменті фоторецепторів.

На 14 добу (рис. 2С – див. 2 стор. обкладинки) перелічені явища доповнювалися імунопозитивним забарвленням волокон внутрішнього плексіформного шару і більш інтенсивним забарвленням внутрішнього сегменту фоторецепторів. Крім того, забарвлення середньої інтенсивності відмічено у чисельних клітинах зовнішнього плексіформного шару, ймовірно – горизонтальних. На межі внутрішніх ядерного та плексіформного шарів відзначені одиничні відросткові клітини, які спрямовували кошикоподібні відростки у внутрішній ядерний шар, що за морфологією відповідало амакриновим клітинам. Інтенсивність забарвлення сітківки за шкалою D.J. Dabbs складала 2-3 бала.

На 28-у добу на тлі морфологічних проявів розвинутої ДР вище зазначені особливості були наявні (рис. 2D). Чітке позитивне забарвлення мали округлі клітини у стінках розширених судин мікроциркуляторного русла – ендотеліальні клітини. Цікаво, що нейрони зовнішнього та внутрішнього ядерного шарів позитивного забарвлення не мали.

У порівнянні з 1-ю групою, імунопозитивне забарвлення сітківки у 2-й групі на 28 добу було менш вираженим (рис. 2Е – див. 2 стор. обкладинки). Воно зберігалось для клітин Мюллера, у межах гангліонарного шару та у одиничних дрібних відросткових клітинах ядерних шарів. Інтенсивність забарвлення за шкалою D.J. Dabbs складала 1-2 бала.

Фактична відсутність імунопозитивного забарвлення сітківки відмічена у 3-й групі (див. рис. 2F – див. 2 стор. обкладинки). На тлі незначних морфологічних проявів ДР слідове імуноспецифічне забарвлення фіксувалося у гангліонарному шарі. Натомість одиничні гангліонарні клітини знаходилися у стані апоптозу, ймовірно ті, що увійшли в цей стан ще до початку введення інсуліну та імагінібів.

Для окремої оцінки інтенсивності апоптозу у гангліонарних клітинах сітківки була підрахована кількість таких клітин в залежності від інтенсивності забарвлення по групах тварин (рис. 3).

За умов введення інсуліну статистично значуще збільшувалася доля незабарвлених та слабо забарвлених клітин (0-1 балів) при зменшенні інтенсивно

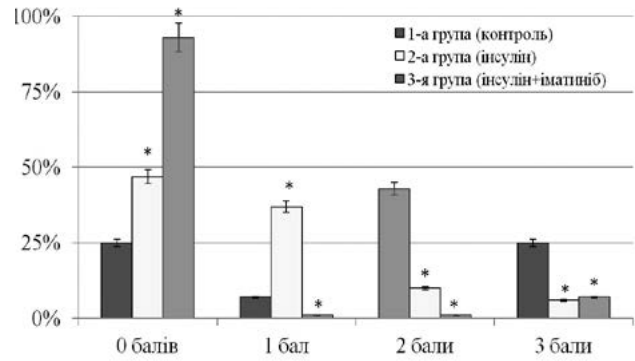


Рис. 3. Гістограма розподілу кількості гангліонарних клітин (%) в залежності від інтенсивності імуноспецифічного забарвлення на каспазу-3 за шкалою D.J. Dabbs [20] у групах тварин на 28 добу. * – $P < 0,05$ у порівнянні з 1-ю групою.

забарвлених клітин (2-3 бала). За умов комбінованого введення інсуліну і імагінібів абсолютна більшість клітин (93%) не мала специфічного забарвлення, тоді як решта клітин мали високо інтенсивне забарвлення. На нашу думку, апоптоз у останніх починався ще до початку введення препаратів, а, отже, імагініб попереджав але ж не зупиняв апоптоз гангліонарних клітин за умов ДР. Ці результати прямо підтверджували гальмівний ефект інсуліну і запобігачий ефект імагінібів щодо активації апоптозу гангліонарних клітин сітківки при експериментальному ЦД.

Таким чином, ІГХД каспази-3 у сітківці показало певну динаміку наростання експресії цього проапоптичного протеїну. В першу чергу апоптоз запускався в клітинах Мюллера. Згодом процес розповсюджувався майже на всі клітинні елементи сітківки, включаючи гангліонарні клітини, глію, ендотелій судин. Виключенням можна вважати нейрони зовнішнього (палички та колбочки) і внутрішнього (біполярні клітини) ядерних шарів, які не дивлячись на наявність морфологічних ознак пошкодження, на жодних термінах імунопозитивного забарвлення не мали.

Проапоптичні протеїни сімейства Вах мають конститутивну експресію мономерних форм, які за умов накопичення внутрішньоклітинних пошкоджень вбудовуються в мембрану мітохондрій з утворенням димерних форм [21]. Це сприяє вивільненню у цитоплазму цитохрому С та запуску мітохондріального шляху апоптозу. Нами було проведено визначення вмісту у сітківці щурів протеїнів Вах (рис. 4).

У 1-й (контрольній) групі вміст мономерів Вах (α і β) у тканині сітківки прогресивно зростав та на 28 добу перевищував початковий рівень у 24 рази (див. рис. 4В). Вміст димерної форми протеїну Вах був максимальним на 7 добу спостереження, що могло відображати значне накопичення продуктів патологічного метаболізму вже на цей термін. Необхідно зазначити, що початковий вміст димерної форми протеїну Вах майже не відрізнявся від нульових значень, склавши

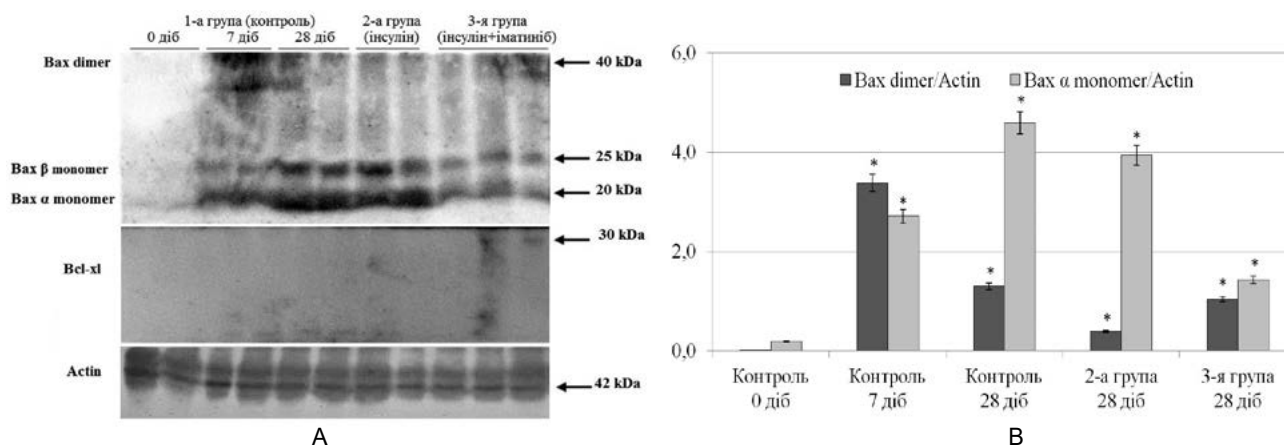


Рис. 4. Вміст протеїнів Bax і Bcl-xl у тканині сітківки у 1-й (контрольній) групі на початку дослідження (0 діб), через 7 і 28 діб, а також через 28 діб у 2-й групі (введення інсуліну) та у 3-й групі (комплексне введення інсуліну та іматинібу);

A – репрезентативні блотограми Bax, Bcl-xl і актину; B – результати денситометричного аналізу блотограм Bax dimer і Bax α monomer (співвідношення до рівня актину); * – $P < 0,05$ порівняно з рівнем на початку дослідження (0 діб).

0,001 ум.од. за відношенням оптичної густини відповідної поліпептидної зони на блотограмах димеру Bax і актину. Через 7 діб вміст димерної форми Bax у тканині сітківки в 1-й (контрольній) групі збільшився до $3,38 \pm 0,02$ ум.од., а через 28 діб – до $1,30 \pm 0,01$ ум.од., тобто – у 3380 і 1300 разів, відповідно.

Такі результати давали можливість стверджувати, що за умов стійкої гіперглікемії експресія мономерних форм протеїну Bax значно збільшувалася, при тому що склалися умови для їх полімеризації і утворення димерної форми. Це могло пояснювати значну активацію апоптозу у тварин 1-ї (контрольної) групи зі стійкою та вираженою гіперглікемією, що було вище показано імуногістохімічно по активації ефекторної каспази-3. Введення інсуліну та, більшою мірою, інсуліну з іматинібом зменшувало як експресію мономерних форм протеїну Bax, так і вміст димерної форми (див. рис. 4B), що, відповідно, супроводжувалося гальмуванням апоптозу.

Обговорення

Відомо, що протеїн Bcl-xL має антиапоптичні властивості за рахунок індукції дисоціації олігомерів Bax [21]. Імуноблотингове дослідження вмісту антиапоптичного протеїну Bcl-xl у тканині сітківки не виявило його ані на початку дослідження, ані через 28 діб у 1-й та 2-й групі (див. рис. 4A). Натомість, у 3-й групі через 28 діб виявлялося незначне накопичення цього протеїну, що могло свідчити про активацію антиапоптичних механізмів за умов використання іматинібу та пояснювало фактичну відсутність апоптозу клітин у сітківках цієї групи тварин. Отже можна припустити, що ще одним захисним механізмом впливу блокади тирозинових протеїнкіназ є індукція експресії антиапоптичного протеїну Bcl-xl.

В плані обговорення отриманих даних необхідно зазначити, що підвищення рівнів запальних маркерів,

збільшення проапоптотичної каспази-3, Fas та Bax у гангліонарних клітинах та сітківці людини та експериментальних шурів з ЦД, а також підвищення рівнів експресії білків Bax, Fas, Fas/FasL, активних каспаз-3, -8 та -9 на даний час добре відомо та узгоджується з отриманими нами результатами [8, 22].

Показана нами більша схильність до апоптозу внутрішніх шарів сітківки може пояснюватися підвищеною їх сприйнятливістю до гіперглікемії [23]. Розташовані у внутрішній частині сітківки клітини (гангліонарні та амакринові) демонстрували більш важку дегенерацію порівняно з нейронними клітинами, розташованими ближче до зовнішньої частини сітківки [24]. У клінічних дослідженнях за допомогою оптичної когерентної томографії визначено зменшення товщини внутрішніх шарів сітківки та шару нервових волокон, що є прямим наслідком підвищеної апоптотичної загибелі клітин [25]. Саме гангліонарні та амакринові клітини ідентифіковані як перші нейрони, що беруть участь у апоптозі, викликаному ЦД [25]. У цій же роботі встановлено порушення фоторецепторів, що підтверджувало й наш дані щодо активації каспази-3 у внутрішньому сегменті фоторецепторів.

Серед патологічних шляхів ДР, таких як метаболічні порушення, оксидативний стрес, стрес ендоплазматичного ретикулу, стимуляція факторів росту, значна роль належить апоптозу як фактору, що супроводжує мляве хронічне запалення сітківки, яке, у свою чергу, приводить до збільшення проникності судин, неоваскуляризації та пошкодження нейронів [26]. Незалежно від того, які механізми викликають ДР, апоптоз є тригерним важелем, який запускає ураження нейронів та визначає кінцеву загибель клітин, що дає змогу припустити можливість попередження нейродегенерації при ДР за рахунок його інгібування [27]. Так, наприклад, введення інгібітору кальпаїну попереджало загибель гангліонарних клітин у мишей з ЦД [28], діста,

збагачена на антиоксидант лютеїн знижувала кількість активних форм кисню у сітківці та прояви апоптозу у мишей з ЦД [29]. Блокада внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, обумовлених протеїновими тирозинкіназами також гальмує розвиток ДР. Так, білок-інгібітор кінази Raf-1 попереджає виникнення діабетичної нейродегенерації сітківки та активність каспази-3 за рахунок гальмування шляху p38MAPK [30].

Таким чином, показано у ході нашого дослідження поступове збільшення експресії каспази-3 у структурних елементах сітківки щурів зі стрептозоточином діабетом та накопичення вмісту протеїнів Вах узгоджувалося з наявними даними літератури. Отримане нами гальмування апоптозу та менший приріст вмісту Вах при введенні інсуліну було досить очікуваним результатом, який міг пояснюватися меншою глікемією. Натомість, майже повне гальмування експресії каспази-3 та зниження вмісту протеїнів Вах при додатковому до інсуліну введенні імаїнібу було досить неочікуваним фактом. Аналогів таких досліджень у доступній літературі нами не знайдено. Також до неочікуваного результату належала індукція утворення у сітківці антиапоптичного протеїну Bcl-xl, що може вказувати на ще один ефект блокади тирозинових протеїнкіназ імаїнібом.

Висновок

Стійка гіперглікемія вже протягом 7-28 діб призвела до розвитку прогресуючих фенотипічних проявів ДР, активації каспази-3 у структурних елементах сітківки, особливо, у внутрішніх шарах, значного накопичення проапоптичних протеїнів Вах. Введення інсуліну і, більшою мірою, інсуліну з імаїнібом гальмувало розвиток ДР та запобігало збільшенню вмісту протеїнів Вах. Блокада тирозинових протеїнкіназ імаїнібом індукувала накопичення у сітківці антиапоптичного ензиму Bcl-xl. Отримані результати дають підґрунтя для застосування блокаторів тирозинових протеїнкіназ, зокрема імаїнібу, для попередження розвитку ДР шляхом інгібування надмірного апоптозу клітин сітківки.

Література

1. **Wong TY, Sabanayagam C.** Strategies to Tackle the Global Burden of Diabetic Retinopathy: From Epidemiology to Artificial Intelligence. *Ophthalmologica*. 2020;243(1):9-20.
2. **Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, et al.** IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*. 2022 Jan;183:109119.
3. **Wang W, Lo ACY.** Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Treatments. *Int J Mol Sci*. 2018 Jun 20;19(6):1816.
4. **Brownlee M.** The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005 Jun;54(6):1615-25.
5. **Elmore S.** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007 Jun;35(4):495-516.
6. **Eskandari E, Eaves CJ.** Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *J Cell Biol*. 2022 Jun 6;221(6):e202201159.
7. **Van Opdenbosch N, Lamkanfi M.** Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity*. 2019 Jun 18;50(6):1352-1364.
8. **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.
9. **Wu W, Xie Z, Zhang Q, Ma Y, Bi X, Yang X, Li B, Chen J.** Hyperoside Ameliorates Diabetic Retinopathy via Anti-Oxidation, Inhibiting Cell Damage and Apoptosis Induced by High Glucose. *Front Pharmacol*. 2020 May 29;11:797.
10. **Hernández C, García-Ramírez M, Corraliza L, Fernández-Carneado J, Farrera-Sinfreu J, Ponsati B, et al.** Topical administration of somatostatin prevents retinal neurodegeneration in experimental diabetes. *Diabetes*. 2013 Jul;62(7):2569-78.
11. **Gavi S, Shumay E, Wang H, Malbon C.** G-protein-coupled receptors and tyrosine kinases: crossroads in cell signaling and regulation. *Trends Endocrinol. Metab*. 2006;17(2): 46-52.
12. **Maruyama IN.** Mechanisms of activation of receptor tyrosine kinases: monomers or dimers. *Cells*. 2014 Apr 22;3(2):304-30.
13. **Siddle K.** Molecular basis of signaling specificity of insulin and IGF receptors: neglected corners and recent advances. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012 Feb 28;3:34.
14. **Liu Y, Chen J, Liang H, Cai Y, Li X, et al.** Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells not only ameliorate blood glucose but also protect vascular endothelium from diabetic damage through a paracrine mechanism mediated by MAPK/ERK signaling. *Stem Cell Res Ther*. 2022 Jun 17;13(1):258.
15. **Guo Y, Guo C, Ha W, Ding Z.** Carnosine improves diabetic retinopathy via the MAPK/ERK pathway. *Exp Ther Med*. 2019 Apr;17(4):2641-2647.
16. **Liu F, Ma Y, Xu Y.** Taxifolin Shows Anticataractogenesis and Attenuates Diabetic Retinopathy in STZ-Diabetic Rats via Suppression of Aldose Reductase, Oxidative Stress, and MAPK Signaling Pathway. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2020;20(4):599-608.
17. **Hymowitz SG, Malek S.** Targeting the MAPK Pathway in RAS Mutant Cancers. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018 Nov 1;8(11):a031492.
18. **Waller CF.** Imatinib Mesylate. *Recent Results Cancer Res*. 2018;212:1-27.
19. **Boneva SK, Wolf J, Hajdú RI, Prinz G, Salié H, et al.** In-Depth Molecular Characterization of Neovascular Membranes Suggests a Role for Hyalocyte-to-Myofibroblast Transdifferentiation in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Front Immunol*. 2021 Nov 2;12:757607.
20. **Dabbs D.** Diagnostic Immunohistochemistry, 4th Edition Theranostic and genomic applications. 2014. 960 p.
21. **Subburaj Y, Cosentino K, Axmann M, Pedrueza-Villalmanzo E, et al.** Bax monomers form dimer units in the membrane that further self-assemble into multiple oligomeric species. *Nat Commun*. 2015 Aug 14;6:8042.
22. **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 miR 128 expression in diabetic rats. *Int J Mol Med*. 2020 Jul;46(1):340-350.
23. **Hombrebueno JR, Ali IH, Xu H, Chen M.** Sustained intravitreal VEGF neutralization results in retinal neurodegeneration in the Ins2(Akita) diabetic mouse. *Sci Rep*. 2015 Dec 16;5:18316.
24. **Damian I, Nicoară SD.** Correlations between Retinal Arterial Morphometric Parameters and Neurodegeneration in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus with No or Mild Diabetic Retinopathy. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Mar 5;57(3):244.
25. **Simó R, Stitt AW, Gardner TW.** Neurodegeneration in diabetic retinopathy: does it really matter? *Diabetologia*. 2018 Sep;61(9):1902-1912.
26. **Himasa FI, Singhal M, Ojha A, Kumar B.** Prospective for Diagnosis and Treatment of Diabetic Retinopathy. *Curr Pharm Des*. 2022;28(7):560-569.
27. **Stem MS, Gardner TW.** Neurodegeneration in the pathogenesis of diabetic retinopathy: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Curr Med Chem*. 2013;20(26):3241-50.
28. **Shanab AY, Nakazawa T, Ryu M, Tanaka Y, Himori N, et al.** Metabolic stress response implicated in diabetic retinopathy: the role of calpain, and the therapeutic impact of calpain inhibitor. *Neurobiol Dis*. 2012 Dec;48(3):556-67.
29. **Sasaki M, Ozawa Y, Kurihara T, Kubota S, Yuki K, Noda K, et al.** Neurodegenerative influence of oxidative stress in the retina of a murine model of diabetes. *Diabetologia*. 2010 May;53(5):971-9.
30. **Wu C, Xu K, Liu W, Liu A, Liang H, et al.** Protective Effect of Raf-1 Kinase Inhibitory Protein on Diabetic Retinal Neurodegeneration through P38-MAPK Pathway. *Curr Eye Res*. 2022 Jan;47(1):135-142.

Відомості про авторів та розкриття інформації

Внесок авторів. Усі автори брали участь у зборі даних, аналізі результатів, написанні рукопису та погодили кінцевий варіант рукопису.

Конфлікт інтересів. Автори засвідчують про відсутність конфлікту інтересів, який б міг вплинути на їх думку стосовно предмету чи матеріалів, описаних та обговорених в даному рукопису.

Відмова від відповідальності. Автори заявляють, що висловлені у поданій статті думки є їх власними, а не офіційними позиціями установи.

Надійшла 19.07.2023