

**Катерина Усенко***

Кандидат медичних наук, доцент
Національний медичний університет імені О. О. Богомольця
01601, бульвар Т. Шевченка, 13, м. Київ, Україна
<https://orcid.org/0000-0001-9907-6109>

Сергій Зяблицев

Доктор медичних наук, професор
Національний медичний університет імені О. О. Богомольця
01601, бульвар Т. Шевченка, 13, м. Київ, Україна
<https://orcid.org/0000-0002-5309-3728>

Олена Дядик

Доктор медичних наук, професор
Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика
04112, вул. Дорогожицька, 9, м. Київ, Україна
<https://orcid.org/0000-0002-9912-4286>

Експресія протеїнів PMS2 і p53 у тканинах сітківці при експериментальній діабетичній ретинопатії та вплив на неї інсуліну і інгібування клітинних протеїнкіназ

Анотація

Актуальність. Актуальність дослідження полягає у необхідності з'ясування ролі механізмів репарації ДНК та геномного стресу в патогенезі діабетичної ретинопатії для пошуку нових терапевтичних мішеней.

Мета. Визначити експресію протеїнів PMS2 та p53 у тканинах сітківки щурів при експериментальній діабетичній ретинопатії (ДР) та оцінити вплив інсуліну і блокатора клітинних протеїнкіназ сорафенібу.

Матеріали та методи. Дослідження виконано на 50 щурах-самцях лінії Wistar. Цукровий діабет моделювався одноразовим внутрішньоочеревинним введенням стрептозотоцину (50 мг/кг). Через 7 діб тварин зі стійкою гіперглікемією було рандомізовано на групи: без лікування, лікування інсуліном та комбіноване лікування інсуліном і сорафенібом. Тварин було виведено з експерименту через 7, 28 діб та 3 місяці. Імуногістохімічне дослідження виконувалося із використанням антитіл до PMS2 та p53. Частку імунопозитивних клітин визначали на 100 клітин у 5 полях зору.

Результати дослідження. У інтактних тварин PMS2- та p53-імунореактивність була мінімальною. При розвитку експериментальної ДР кількість позитивно забарвлених клітин прогресивно збільшувалася. PMS2-позитивні клітини локалізувалися переважно у шарі гангліонарних клітин та плексіформних шарах сітківки, тоді як p53-позитивні клітини були більшою мірою асоційовані із судинним руслом. Лікування інсуліном та сорафенібом супроводжувалося підвищенням експресії обох маркерів, найбільш вираженим при комбінованому введенні препаратів. Через 3 місяці комбінована терапія збільшувала частку PMS2-позитивних клітин у 2,5 раза, а p53-позитивних – у 3,5 раза порівняно з контрольною групою ($p < 0,05$).

Висновок. Розвиток експериментальної ДР супроводжується активацією PMS2- та p53-асоційованої клітинної відповіді на пошкодження ДНК у тканинах сітківки. Підвищення експресії PMS2 при лікуванні інсуліном та сорафенібом може відображати активацію MMR-асоційованих репаративно-адаптивних механізмів. Отримані результати дозволяють розглядати PMS2 як перспективний маркер геномного стресу при діабетичній ретинопатії.

Ключові слова: репарація ДНК; геномний стрес; імуногістохімія; сорафеніб; реплікація.

Приклад цитування:

Usenko K, Ziablitshev S, Diadyk O. Expression of PMS2 and p53 proteins in retinal tissues in experimental diabetic retinopathy and the effects of insulin and cellular protein kinase inhibition. Med Sci Ukr. 2026;22(2):48-55. DOI: <https://doi.org/10.32345/2664-4738.2.2026.06>

*Автор-кореспондент (usenko1205@gmail.com)



Copyright © The Author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

ВСТУП

З початку 2000-х років увагу дослідників у галузі біології та медицини зосереджено на механізмах репарації ДНК. J.A. Awosika *et al.* [1] показано, що репарація неспарених нуклеотидів (MMR) покращує точність реплікації ДНК на кілька порядків, тоді як втрата MMR призводить до мутаторного фенотипу, що викликає схильність до раку. У дослідженні M.G. Marinus [2] зазначено, що репарація невідповідностей це висококонсервативний механізм, який зустрічається у всіх царствах життя. Загалом, роль репарації невідповідностей полягає у збереженні послідовності ДНК шляхом видалення неправильних пар основ, створених внаслідок реплікації або гомологічної рекомбінації. У вищих організмів вона також необхідна для успішного мейозу та мітозу, а також для різноманітності імуноглобулінів. У людей дефектна репарація невідповідностей пов'язана зі спорадичними та спадковими видами раку, особливо неполіпозним раком товстої кишки. У роботі U. Chakraborty & E. Alani [3] представлено роль ключових білків репарації. Одним із ключових компонентів MMR є білок PMS2, що кодується однойменним геном. Як зазначали Y. He *et al.* [4], PMS2 входить до складу гетеродимерного комплексу MutLα (MLH1/PMS2), який забезпечує розпізнавання та усунення помилок реплікації ДНК, зокрема неправильного спарювання нуклеотидів та інсерцій/делецій, що виникають під час клітинного поділу. Білок PMS2 характеризується ендонуклеазною активністю та бере участь у ініціації процесу репарації шляхом розриву пошкодженої ділянки ДНК. Порушення його експресії призводить до дефекту системи MMR, накопичення мутацій і розвитку мікросателітної нестабільності, що асоційовано з підвищеним ризиком неопластичних процесів [3-4]. Відповідно до матеріалів Y. He *et al.* [4] та V. Lee *et al.* [5], у клінічній практиці експресію PMS2 оцінюють імуногістохімічно: відсутність ядерного забарвлення в пухлинних клітинах за наявності внутрішнього контролю (строма) розглядається як ознака дефекту MMR. Таким чином, PMS2 розглядається як маркер порушення геномної стабільності.

Водночас дані щодо експресії PMS2 у тканинах сітківки, зокрема при діабетичній ретинопатії (ДР), практично відсутні. Сучасні уявлення про патогенез ДР, висвітлені у публікаціях A.K. Moya *et al.* [6], Y. Yulistira *et al.* [7] і A. Callan *et al.* [8], зосереджені переважно на ролі оксидативного стресу, хронічного запалення, нейродегенерації, реактивного гіюзу, ангиогенезу (зокрема за участю васкулоендотеліального фактора росту, VEGF) та ендотеліальної дисфункції. Разом із тим, за даними M. Zhang *et al.* [9] та Y. Long *et al.* [10], надмірне утворення реактивних форм кисню при гіперглікемії здатне безпосередньо ушкоджувати ДНК, індукуючи дволанцюгові розриви та помилки реплікації. За таких умов можна

очікувати активацію системи клітинної відповіді на пошкодження ДНК, включаючи протеїн p53, полі(АДФ-рибоза)-полімераза (PARP), а також компоненти системи MMR (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) [5, 11]. У цьому контексті PMS2 та p53 потенційно можуть виступати як маркери геномного стресу та активації репаративних процесів у клітинах сітківки при ДР. Метою даного дослідження було визначення експресії протеїнів PMS2 та p53 у тканинах сітківки щурів при експериментальній діабетичній ретинопатії та оцінка впливу лікування інсуліном і блокатором клітинних протеїніназ сорафенібом.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Проведено проспективне експериментальне дослідження на моделі стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету у щурів із рандомізованим розподілом тварин на групи лікування. До дослідження залучено 50 трьохмісячних щурів-самців лінії Wistar вагою 140-160 г. Цукровий діабет 1-го типу моделювали одноразовим внутрішньоочеревинним введенням стрептозотоцину (50 мг/кг; Sigma-Aldrich, Co, China), розчиненого у холодному 0,1 М цитратному буфері (pH4,5). Кожні три доби контролювали рівень глікемії за допомогою глюкометра та одноразових тест-смужок (ACCU-Chek Instant, Roche, Mannheim, Germany) у крові, зібраної з хвостової вени натще. Через 3 доби після ін'єкції вміст глюкози у крові тварин був не менше 15 ммоль/л. Протягом експерименту у тварин відмічена виражена полідипсія, поліурія, кетон- та глюкозурія; тварини суттєво втрачали вагу, що дозволяло вважати адекватною застосовану модель відтворення у щурів інсулінозалежного цукрового діабету з кетозом. У цьому дослідженні тварин спостерігали 3 місяці. Для визначення початкових даних додатково використано 5 інтактних тварин. Через 7 діб тварин зі стійкою гіперглікемією методом сліпої рандомізації розділили на 3 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 HM Penfill, Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Данія) у дозі 30 Од. Тваринам 3-ї групи вводили інсулін (за схемою 2-ї групи), а також *per os* щоденно вводили водний розчин препарату сорафеніб (Сорафеніб 200 мг; Cipla, Індія) у дозі 50 мг/кг.

Тварин виводили з експерименту через 7, 28 діб і 3 місяці у кількості по 5 особин шляхом смертельної ін'єкції тіопенталу (75 мг/кг). Для морфологічних досліджень очі занурювали у 10 % розчин нейтрального формаліну та заливали в парафін. З парафінових блоків на ротаційному мікротомі HM 325 (Thermo Shandon, Англія) виготовляли серійні гістологічні зрізи товщиною 2-3 мкм. Імуногістохімічне дослідження проводили з використанням

моноклональних антитіл до протеїнів PMS2 (мишачі моноклональні анти-PMS2 антитіла; клон A16-4; розведення 1:100; Biocare Medical, США) і p53 (мишачі моноклональні анти-p53 антитіла; клон DO-7; розведення 1:100; Abcam, Велика Британія). Застосовували систему детекції Master Polymer Plus Detection (Master Diagnostica, Іспанія). Демаскування антигенів проводили шляхом термічної обробки зрізів у цитратному буфері (рН 6,0) при 95-98 °C протягом 20 хв. Зрізи додатково забарвлювали гематоксином. Мікроскопічне дослідження та фотоархівування проводили із використанням світлооптичних мікроскопів ZEISS з системою обробки результатів Axio Imager. A2 (Німеччина). Для кожної тварини аналізували 5 незалежних полів зору, після чого обчислювали середнє значення частки імунопозитивних клітин. Групові результати виражали у відсотках та після перевірки нормальності розподілу (критерій Шапіро-Вілка) розраховували у вигляді медіан та міжквартильних розкидів (Me; QI-QIII). Для статистичного аналізу застосовували програмне забезпечення Statistica 10 (StatSoft, Inc., США). Значення порівнювали із застосуванням критерію Краскела-Уолліса, міжгрупові порівняння проводили з використанням критерію Данна; вірогідними вважали різниці при $p < 0,05$. При виконанні роботи керувалися нормами та принципами Directive 2010/63/EU [12], вимогами Law of Ukraine No. 3447-IV [13] та експертним висновком Комісії з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень при Національному медичному університеті імені О. О. Богомольця (затвердження плану виконання дослідження 21.11.2022 р., протокол № 164). Тварин тримали в умовах віварію на стандартному раціоні. Висловлені у поданій статті думки є авторськими, а не офіційними позиціями установи.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що патологічний процес супроводжувався зменшенням клітинної щільності в ядерних шарах сітківки, розвитком дифузного тканинного набряку, найбільш вираженого у внутрішньому плексіформному шарі, а також формуванням ділянок ішемії, що поєднувалися з вакуолізацією цитоплазми нейронів. Судини хоріоїдеї та внутрішнього судинного сплетіння були дилатовані, місцями відзначалися ознаки мікротромбоутворення. Уздовж внутрішньої поверхні сітківки спостерігалися численні судинні порушення у вигляді мікроаневризм. Кількість гангліонарних клітин зменшувалася, при цьому вони демонстрували ознаки дегенеративних змін, включаючи клітинний набряк та пікноз ядер. Зазначені морфологічні зміни мали прогресуючий характер у динаміці – від 7-ї доби до 3 місяців спостереження. На пізніх термінах експерименту у зовнішньому ядерному шарі виявлялися клітинні проліферати у вигляді щільних скупчень базofilних

клітин із тенденцією до радіального поширення за межі шару. Паралельно відмічалось потовщення та ущільнення внутрішньої обмежувальної мембрани, що супроводжувалося накопиченням грубоволокнистих базofilних структур. Розширення мікросудин уздовж внутрішньої поверхні сітківки спостерігалось і у інтактних тварин, однак вони характеризувалися малим діаметром, тонкою стінкою та наявністю одного просвіту. Натомість мікроаневризми, які формувалися при тривалому перебігу ДР, відзначалися більш складною будовою – наявністю кількох просвітів, оточених щільною мембраною. Також визначалися виражений набряк та розповсюджені зони ішемії. Кількість гангліонарних клітин зменшувалася, при цьому вони набували виражених дегенеративних ознак. Одночасно відзначалося збільшення кількості та розмірів клітин Мюллера, що відповідало картині реактивного гліозу.

Застосування інсуліну або сорафенібу супроводжувалося менш вираженими морфологічними змінами. У цих групах не відзначалося зниження щільності клітин ядерних шарів, а набряк і ішемічні ураження сітківки були мінімальними або відсутніми. Водночас зберігалися окремі ознаки ураження, зокрема зменшення кількості гангліонарних клітин і формування клітинних проліфератів. Найбільш виражений протективний ефект спостерігався при комбінованому застосуванні інсуліну та сорафенібу. У цих умовах структура сітківки залишалася близькою до норми, а морфологічні ознаки ДР, характерні для контрольної групи, практично не визначалися. Зокрема, не виявлялися типові прояви патологічного ангіогенезу та клітинних проліферативних змін. Специфічне PMS2-імунорективне забарвлення у сітківці інтактних щурів практично не визначалося; поодинокі позитивні клітини виявлялися переважно у шарі гангліонарних клітин (Рис. 1а). У контрольній групі тварин із експериментальною ДР PMS2-позитивні клітини локалізувалися переважно вздовж внутрішньої поверхні сітківки, у шарі гангліонарних клітин та зовнішньому плексіформному шарі (Рис. 1б, 1в). Імунорективність мала як ядерну, так і цитоплазматичну локалізацію, при цьому інтенсивність ядерного забарвлення стабільно переважала цитоплазматичну. Застосування інсуліну супроводжувалося збільшенням кількості PMS2-позитивних клітин без зміни їх переважної локалізації (Рис. 1г). Подібний ефект спостерігався і при введенні сорафенібу (Рис. 1д). Максимальна вираженість PMS2-імунорективності визначалась при комбінованому застосуванні інсуліну та сорафенібу (Рис. 1е). Аналогічний характер змін був притаманний експресії p53 (Рис. 2а). p53-позитивні клітини виявлялися у шарі гангліонарних клітин та зовнішньому плексіформному шарі. Введення інсуліну та сорафенібу супроводжувалося збільшенням кількості позитивно

забарвлених клітин (Рис. 2,б-2г). Водночас р53-імунореактивність переважно асоціювалася із судинним руслом: позитивні клітини локалізувалися

вздовж внутрішньої поверхні сітківки навколо мікроаневризму та у зовнішньому плексіформному шарі – по ходу судин внутрішнього сплетіння.

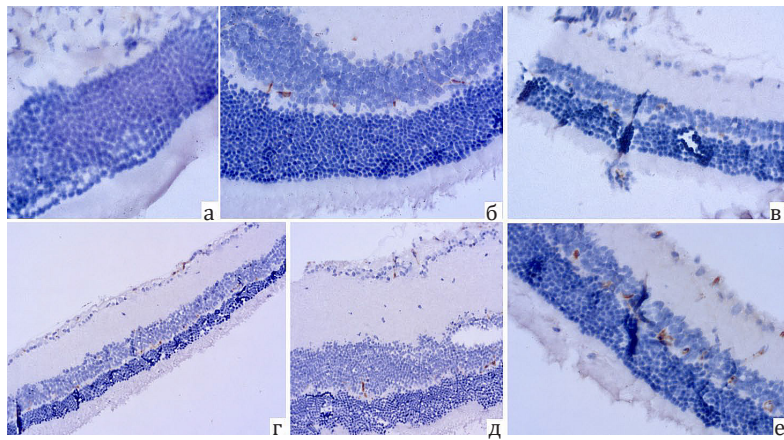


Рисунок 1. Мікропрепарати сітківки щурів на 7-му добу та через 3 місяці після моделювання діабетичної ретинопатії: імунгістохімічна експресія PMS2 із дофарбуванням гематоксилином, $\times 200$

Примітки: а – до введення стрептозотоцину (інтактний щур); б – контрольна група (7 діб); в – контрольна група (через 3 місяці); г – введення інсуліну; д – введення сорафенібу; е – введення інсуліну і сорафенібу

Джерело: розроблено авторами

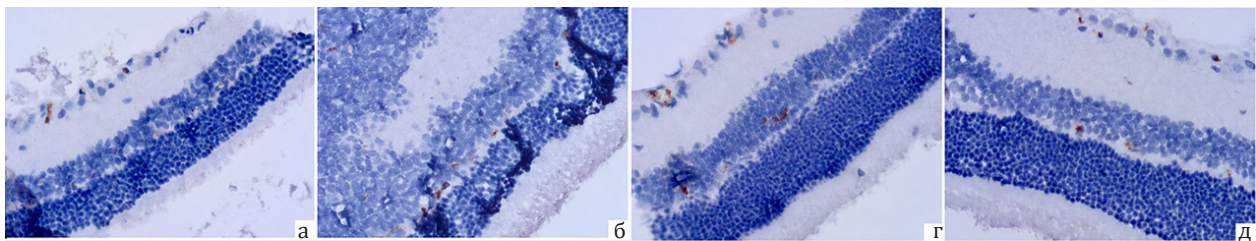


Рисунок 2. Мікропрепарати сітківки щурів через 3 місяці після моделювання діабетичної ретинопатії: репрезентативні результати імунгістохімічного забарвлення на р53 із дофарбуванням гематоксилином, $\times 400$

Примітки: а – контрольна група; б – введення інсуліну; в – введення сорафенібу; д – введення інсуліну і сорафенібу

Джерело: розроблено авторами

Кількісна характеристика частки імунопозитивних клітин наведена на Рисунку 3. У контрольній групі частка PMS2-позитивних клітин поступово збільшувалася протягом експерименту (у 1,3-1,8 раза; $p < 0,05$). Через 3 місяці окреме застосування інсуліну та сорафенібу супроводжувалося

приблизно однаковим підвищенням показника порівняно з контролем (у 1,7 раза; $p < 0,05$). Найбільш виражені зміни спостерігалися при комбінованому введенні препаратів, коли частка PMS2-позитивних клітин перевищувала контрольні значення у 2,5 раза ($p < 0,05$).

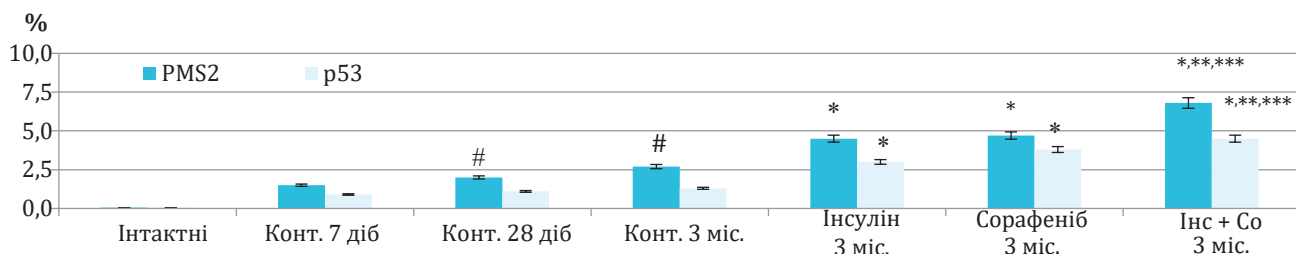


Рисунок 3. Частка PMS2- та р53-позитивних клітин у сітківці (% до загальної кількості клітин)

Примітки: інтактні – середні дані у інтактних тварин; конт. 7, 28 діб і 3 міс. – дані контрольної групи; інсулін – введення інсуліну; сорафеніб – введення сорафенібу; інс+сор – комбіноване введення інсуліну і сорафенібу; # – $p < 0,05$ порівняно з контролем на 7-му добу; * – $p < 0,05$ порівняно з контролем через 3 місяці; ** – $p < 0,05$ порівняно з введенням інсуліну; *** – $p < 0,05$ порівняно з введенням сорафенібу

Джерело: розроблено авторами

Подібна динаміка була характерною і для p53, однак вираженість змін була меншою (Рис. 3). У контрольній групі відзначалася тенденція до збільшення кількості p53-позитивних клітин, яка не досягала статистичної значущості ($p > 0,05$). Окреме застосування інсуліну та сорафенібу збільшувало частку позитивних клітин у 2,3-2,9 раза ($p < 0,05$), тоді як комбіноване введення препаратів супроводжувалося максимальним підвищенням показника – у 3,5 раза порівняно з контролем ($p < 0,05$). Таким чином, розвиток експериментальної ДР супроводжувався підвищенням експресії PMS2 та p53 у тканинах сітківки. Лікування інсуліном і сорафенібом посилювало імуногістохімічну експресію обох маркерів, причому більш виражені зміни були характерні для PMS2. Найвищі показники визначалися при комбінованому застосуванні препаратів. Отримані результати відображали активацію експресії протеїнів, асоційованих із клітинною відповіддю на пошкодження ДНК, однак не дозволяли безпосередньо оцінити функціональний стан системи репарації ДНК. У цьому дослідженні встановлено підвищення експресії PMS2 у тканинах сітківки при розвитку експериментальної ДР. Отримані результати узгоджуються із даними J. Sohn *et al.* [16] та S. Roy *et al.* [15] щодо важливої ролі пошкодження ДНК та активації систем клітинної відповіді на генотоксичний стрес у патогенезі діабетичних ускладнень. Відповідно до матеріалів M. Zhang *et al.* [9], метаболічний стрес, гіпоксія, тканинний ацидоз та надмірне утворення реактивних форм кисню при гіперглікемії здатні безпосередньо пошкоджувати ДНК, індуюючи дволанцюгові розриви та помилки реплікації. За таких умов активація PMS2 може відображати залучення MMR-асоційованої системи репарації ДНК. Переважання ядерної локалізації PMS2-імунореактивності додатково підтверджувало активацію клітинної відповіді на пошкодження генетичного матеріалу. Встановлено, що PMS2-позитивні клітини локалізувалися переважно у шарі гангліонарних клітин та плексіформних шарах сітківки. У дослідженні К.О. Usenko [16] було показано, що саме гангліонарні нейрони та клітини Мюллера зазнають найбільш ранніх і виражених змін при експериментальній ДР: у нейронах прогресують дегенеративні процеси, тоді як клітини Мюллера переходять у стан реактивного гліозу. Це дозволяє припустити, що ушкодження ДНК та активація систем репарації найбільш активно відбуваються саме у цих клітинних популяціях. Крім того, існують дані, зокрема дослідження J. Ren *et al.* [17], щодо можливого абортного повернення нейронів сітківки у клітинний цикл при нейродегенеративних процесах, що також може супроводжуватися активацією MMR-залежних механізмів.

Паралельно зі збільшенням експресії PMS2 у тканинах сітківки відзначалося підвищення

експресії p53. W.P. Roos *et al.* [11] зазначали, що активація p53 є однією з ключових ланок клітинної відповіді на тяжке пошкодження ДНК та оксидативний стрес. При цьому p53-позитивні клітини переважно локалізувалися вздовж судинного русла та навколо мікроаневризм, що допускає участь ендотеліального стресу і мікросудинного ушкодження у формуванні даної імунореактивності. Водночас вираженість експресії p53 була значно меншою порівняно з PMS2. Така дисоціація між високою PMS2-імунореактивністю та слабкою осередковою p53-позитивністю може свідчити про переважання MMR-асоційованої репаративно-адаптивної відповіді над p53-опосередкованим проапоптотичним сценарієм. На перший погляд парадоксальним виглядає збільшення кількості PMS2- та p53-позитивних клітин під впливом інсуліну. Однак зниження гіперглікемії та послаблення метаболічного стресу під дією інсуліну, ймовірно, створюють умови для активації репаративних процесів. На думку D.D. Liu *et al.* [18], важливе значення може мати феномен «метаболічної пам'яті», за якого епігенетичні зміни та пошкодження ДНК зберігаються навіть після нормалізації рівня глюкози крові. У цьому контексті збільшення PMS2-імунопозитивності можна розглядати як компенсаторний механізм, спрямований на подолання накопичених генетичних пошкоджень у тканинах сітківки. Особливий інтерес викликало суттєве збільшення частки PMS2-позитивних клітин при комбінованому застосуванні інсуліну та сорафенібу. Отримані результати узгоджуються з роботою A. Callan *et al.* [8] щодо ролі кіназних сигнальних шляхів у розвитку ДР, включаючи механізми внутрішньоклітинного сигналізу, нейрозапалення, реактивного гліозу та ангіогенного ремоделювання.

У дослідженні К.О. Usenko *et al.* [19] було показано, що блокада клітинних протеїніназ сорафенібом супроводжується зниженням експресії VEGF у сітківці при експериментальній ДР та пригніченням реактивного гліозу. Отримані у цьому дослідженні результати доповнюють наведені дані та дозволяють припустити участь MMR-асоційованих механізмів у реалізації протективного ефекту блокади клітинних протеїніназ. Також К.О. Usenko *et al.* було встановлено, що при експериментальній ДР різко зростають експресія каспази-3 та вміст протеїну Вах у тканинах сітківки, тоді як введення інсуліну – як окремо, так і у комбінації з сорафенібом – знижувало рівень цих проапоптотичних білків та гальмувало морфологічні прояви ДР. У зв'язку з цим підвищення PMS2 на тлі лікування не слід розглядати як безпосередню ознаку посилення апоптозу. Навпаки, отримані дані дозволяють припустити, що лікування інсуліном, особливо у поєднанні з сорафенібом, може зміщувати клітинну відповідь на діабет-індуковане ушкодження від p53-залежного

апоптотичного сценарію до репаративно-адаптивної відповіді, асоційованої з активацією MMR-системи. Відповідно до J.A. Awosika *et al.* [1], PMS2 бере участь не лише у процесах репарації ДНК, але й у регуляції p53-залежного апоптозу та клітинної відповіді на тяжке пошкодження генетичного матеріалу. Це узгоджується з даними A.J. Barber *et al.* [20] щодо апоптозу перичитів, нейродегенерації та загибелі гангліонарних клітин при ДР. Таким чином, підвищення експресії PMS2 може відображати комплексну адаптивну реакцію клітин сітківки, спрямовану як на підтримання геномної стабільності, так і на контроль ушкоджених клітин. Необхідно зазначити, що в сучасній офтальмології PMS2 практично не досліджується. Це пов'язано з тим, що даний протеїн традиційно розглядають переважно як онкопатологічний маркер, тоді як ДР класично вивчають у контексті мікроангіопатії, нейрозапалення та нейродегенерації [21-22]. Проте сучасні уявлення про патогенез ДР, зокрема публікації J. Sohn *et al.* [14] та S. Roy *et al.* [15], дедалі більше акцентують увагу на ролі пошкодження ДНК, клітинного старіння, епігенетичних порушень та мітохондріальної дисфункції. У цьому контексті оцінка PMS2-імунореактивності може становити перспективний напрямок дослідження порушень систем репарації ДНК при ДР.

ВИСНОВКИ

1. При розвитку експериментальної діабетичної ретинопатії у сітківці щурів відзначалося прогресуюче збільшення експресії PMS2 та, меншою мірою, p53, що свідчило про активацію клітинної відповіді на пошкодження ДНК.
2. PMS2-позитивні клітини локалізувалися переважно у шарі гангліонарних клітин та плексіформних шарах сітківки, тоді як p53-імунореактивність була більшою мірою асоційована із судинним руслом, що може свідчити про залучення

як нейрональних, так і мікросудинних компонентів сітківки до процесів геномного стресу при діабетичній ретинопатії.

3. Застосування інсуліну та сорафенібу супроводжувалося підвищенням експресії PMS2 та p53, найбільш вираженим при їх комбінованому введенні, що може відображати активацію MMR-асоційованої репаративно-адаптивної відповіді у клітинах сітківки.

4. Отримані результати дозволяють розглядати PMS2 як перспективний маркер клітинної відповіді на пошкодження ДНК при діабетичній ретинопатії та обґрунтовують доцільність подальшого вивчення систем репарації ДНК у патогенезі діабетичного ушкодження сітківки.

Обмеженням дослідження було те, що оцінка PMS2 та p53 базувалася виключно на імуногістохімічному аналізі без визначення функціональної активності систем репарації ДНК та MMR-асоційованих сигнальних шляхів.

Перспективним напрямком подальших досліджень може бути комплексна оцінка експресії та функціональної активності PMS2, MLH1 та інших компонентів системи репарації ДНК у тканинах сітківки при ДР.

ПОДЯКИ

Немає.

ФІНАНСУВАННЯ

Дане дослідження виконано за бюджетною програмою МОЗ України, державний реєстраційний номер 0126U001773.

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Будь-які конфлікти інтересів відсутні. Автори статті не брали участі у процесі рецензування чи прийняття редакційних рішень щодо власного рукопису.

ДЖЕРЕЛА

- [1] Awosika JA, Gulley JL, Pastor DM. Deficient mismatch repair and microsatellite instability in solid tumors. *Int J Mol Sci.* 2025;26(9):4394. DOI: [10.3390/ijms26094394](https://doi.org/10.3390/ijms26094394)
- [2] Marinus MG. DNA mismatch repair. *EcoSal Plus.* 2012;5(1). DOI: [10.1128/ecosalplus.7.2.5](https://doi.org/10.1128/ecosalplus.7.2.5)
- [3] Chakraborty U, Alani E. Understanding how mismatch repair proteins participate in the repair/anti-recombination decision. *FEMS Yeast Res.* 2016;16(6):fow071. DOI: [10.1093/femsyr/fow071](https://doi.org/10.1093/femsyr/fow071)
- [4] He Y, Zhang L, Zhou R, Wang Y, Chen H. The role of DNA mismatch repair in immunotherapy of human cancer. *Int J Biol Sci.* 2022;18(7):2821–32. DOI: [10.7150/ijbs.71714](https://doi.org/10.7150/ijbs.71714)
- [5] Lee V, Murphy A, Le DT, Diaz LA Jr. Mismatch repair deficiency and response to immune checkpoint blockade. *Oncologist.* 2016;21(10):1200–11. DOI: [10.1634/theoncologist.2016-0046](https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0046)
- [6] Morya AK, Ramesh PV, Nishant P, Kaur K, Gurnani B, Heda A, et al. Diabetic retinopathy: A review on its pathophysiology and novel treatment modalities. *World J Methodol.* 2024;14(4):95881. DOI: [10.5662/wjm.v14.i4.95881](https://doi.org/10.5662/wjm.v14.i4.95881)
- [7] Yudistira Y, Hendrawan KA, Andayani A, Ari Suryathi NM. Diabetic retinopathy: Pathogenesis, pathophysiology, and treatment. *Univ Med.* 2025;44(2):270–84. DOI: [10.18051/UnivMed.2025.v44.270-284](https://doi.org/10.18051/UnivMed.2025.v44.270-284)
- [8] 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](https://doi.org/10.2174/0115701611272737240426050930)
- [9] Zhang M, Zhang R, Zhao X, Ma Z, Xin J, Xu S, et al. The role of oxidative stress in the pathogenesis of ocular diseases: An

- overview. *Mol Biol Rep.* 2024;51(1):454. DOI: [10.1007/s11033-024-09425-5](https://doi.org/10.1007/s11033-024-09425-5)
- [10] Long Y, Shi H, Ye J, Qi X. Complex relationship between oxidative stress and ovarian cancer: Prevention and therapeutic implications. *Antioxidants.* 2025;14(1):114. DOI: [10.3390/antiox14010114](https://doi.org/10.3390/antiox14010114)
- [11] Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett.* 2013;332(2):237–48. DOI: [10.1016/j.canlet.2012.01.007](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.007)
- [12] Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes [Internet]. 2010 September 22 [cited 2026 January 2]. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj/eng>
- [13] Law of Ukraine No. 3447-IV. On Protection of Animals from Cruel Treatment [Internet]. 2006 February 21 [cited 2026 January 2]. Available from: https://protocol.ua/ua/pro_zahist_tvarin_vid_gorstokogo_povodgennya/
- [14] Sohn J, Lee SE, Shim EY. DNA damage and repair in eye diseases. *Int J Mol Sci.* 2023;24(4):3916. DOI: [10.3390/ijms24043916](https://doi.org/10.3390/ijms24043916)
- [15] Roy S, Kim D, Sankaramoorthy A. Mitochondrial structural changes in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Clin Med.* 2019;8(9):1363. DOI: [10.3390/jcm8091363](https://doi.org/10.3390/jcm8091363)
- [16] Usenko KO. Effect of receptor protein kinase inhibition on the morphogenesis of experimental diabetic retinopathy. *Ukr J Ophthalmol.* 2025;(1):47–53. DOI: [10.31288/oftalmolzh202514753](https://doi.org/10.31288/oftalmolzh202514753)
- [17] Ren J, Zhang S, Pan Y, Jin M, Li J, Luo Y, et al. Diabetic retinopathy: Involved cells, biomarkers, and treatments. *Front Pharmacol.* 2022;13:953691. DOI: [10.3389/fphar.2022.953691](https://doi.org/10.3389/fphar.2022.953691)
- [18] Liu DD, Zhang CY, Zhang JT, Gu LM, Xu GT, Zhang JF. Epigenetic modifications and metabolic memory in diabetic retinopathy: Beyond the surface. *Neural Regen Res.* 2023;18(7):1441–9. DOI: [10.4103/1673-5374.361536](https://doi.org/10.4103/1673-5374.361536)
- [19] Usenko KO, Ziablitshev SV, Yevstifeiev DI, Dyadyk OO, Popova KI. Retinal glial activation in diabetic retinopathy: Therapeutic impact of multikinase inhibition with sorafenib. *Wiad Lek.* 2025;78(7):1309–18. DOI: [10.36740/WLek/208991](https://doi.org/10.36740/WLek/208991)
- [20] Barber AJ, Gardner TW, Abcouwer SF. The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(2):1156–63. DOI: [10.1167/iovs.10-6293](https://doi.org/10.1167/iovs.10-6293)
- [21] Tang L, Xu GT, Zhang JF. Inflammation in diabetic retinopathy: Possible roles in pathogenesis and potential implications for therapy. *Neural Regen Res.* 2023;18(5):976–82. DOI: [10.4103/1673-5374.355743](https://doi.org/10.4103/1673-5374.355743)
- [22] Li Z, Xie L, Zou L, Xiao S, Tao J. Overexpression of RAD54L attenuates osteoarthritis by suppressing the HIF-1 α /VEGF signaling pathway: Bioinformatics analysis and experimental validation. *PLoS One.* 2024;19(4):e0298575. DOI: [10.1371/journal.pone.0298575](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0298575)

Kateryna Usenko

PhD in Medical Sciences, Associate Professor
 Bogomolets National Medical University
 01601, 13 Taras Shevchenko Blvd., Kyiv, Ukraine
<https://orcid.org/0000-0001-9907-6109>

Serhiy Ziablitsev

Doctor of Medical Sciences, Professor
 Bogomolets National Medical University
 01601, 13 Taras Shevchenko Blvd., Kyiv, Ukraine
<https://orcid.org/0000-0002-5309-3728>

Olena Diadyk

Doctor of Medical Sciences, Professor
 P.L. Shupyk National Healthcare University of Ukraine
 04112, 9 Dorohozhytska Str., Kyiv, Ukraine
<https://orcid.org/0000-0002-9912-4286>

Expression of PMS2 and p53 proteins in retinal tissues in experimental diabetic retinopathy and the effects of insulin and cellular protein kinase inhibition

Abstract

Relevance. The relevance of the study lies in the need to clarify the role of DNA repair mechanisms and genomic stress in the pathogenesis of diabetic retinopathy for the search for new therapeutic targets.

Aim. To determine the expression of PMS2 and p53 proteins in the retinal tissues of rats with experimental diabetic retinopathy (DR) and to assess the effects of insulin and the cellular protein kinase blocker sorafenib.

Materials and methods. The study was performed on 50 male Wistar rats. Diabetes mellitus was modelled by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (50 mg/kg). After 7 days, animals with persistent hyperglycaemia were randomised into groups: no treatment, insulin treatment, and combined treatment with insulin and sorafenib. Animals were withdrawn from the experiment after 7 days, 28 days, and 3 months. Immunohistochemical examination was performed using antibodies against PMS2 and p53. The proportion of immunopositive cells was determined per 100 cells in 5 fields of view.

Results. In intact animals, PMS2 and p53 immunoreactivity was minimal. During the development of experimental DR, the number of positively stained cells progressively increased. PMS2-positive cells were localised mainly in the ganglion cell layer and plexiform layers of the retina, whereas p53-positive cells were more strongly associated with the vascular bed. Treatment with insulin and sorafenib was accompanied by increased expression of both markers, with the most pronounced effect after combined administration of the drugs. After 3 months, combined therapy increased the proportion of PMS2-positive cells 2.5-fold and p53-positive cells 3.5-fold compared with the control group ($p < 0.05$).

Conclusions. The development of experimental DR is accompanied by activation of the PMS2- and p53-associated cellular response to DNA damage in retinal tissues. Increased PMS2 expression during treatment with insulin and sorafenib may reflect activation of MMR-associated reparative and adaptive mechanisms. The results support considering PMS2 as a promising marker of genomic stress in diabetic retinopathy.

Keywords: DNA repair; genomic stress; immunohistochemistry; sorafenib; replication.