

ЕКСПРЕСІЯ НЕЙРОФІЛАМЕНТІВ У СІТКІВЦІ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ДІАБЕТИЧНІЙ РЕТИНОПАТІЙ ТА ВПЛИВ АГОНІСТУ БЕНЗОДІАЗЕПІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ КАРБАЦЕТАМУ

Жупан Д.Б. <https://orcid.org/0009-0004-5636-3182>

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна

zsv1965@gmail.com

Актуальність. Одним з типових нейрохімічних патогенетичних механізмів, що обумовлює дисфункцію нейронів сітківки при діабетичній ретинопатії (ДР) є дефіцит ГАМК-ергічної медіації. Це певною мірою обґрунтовує перспективність застосування модуляторів ГАМК-рецепторів, у тому числі – бензодіазепінів.

Ціль: Визначити експресію нейрофіламентів на початкових стадіях розвитку експериментальної ДР та вплив агоністу бензодіазепінових рецепторів карбацетаму.

Матеріали та методи. У 35 трьохмісячних щурів-самців лінії Wistar моделювали ДР шляхом одноразового введення стрептозотоцину (50 мг/кг; Sigma-Aldrich, Co, China). Щурів було розподілено на 3 групи: контрольна, з введенням інсуліну (30 Од; Novo Nordisk A/S, Denmark) і з введенням інсуліну і карбацетаму (5 мг/кг). Імуногістохімічно у сітківці виявляли нейрофіламенти NF-H (2F11; ThermoFisher Scientific, USA).

Результати. До моделювання ДР NF-H-позитивне забарвлення було виявлено у внутрішньому та зовнішньому шарах сітківки у переважно поздовжніх волокнах різної протяжності, які відповідали аксонам горизонтальних та амакрінових клітин; а також у волокнах та аксональних пагорбах гангліонарних нейронів. У динаміці розвитку ДР у плексіформних шарах сітківки спостерігалось прогресуюче зниження інтенсивності забарвлення. У шарі нервових волокон забарвлення концентрувалось навколо розширених мікросудин, які мали тенденцію до утворення мікроаневризм. На 28-му добу у внутрішньому плексіформному шарі NF-H-позитивне забарвлення зникало. Введення інсуліну з карбацетамом запобігало втраті NF-H-позитивного забарвлення у шарах сітківки.

Висновок. Застосування агоніста бензодіазепінових рецепторів карбацетаму може бути перспективним напрямком корекції нейродегенерації сітківки при ДР.

Ключові слова. Цукровий діабет, ГАМК, нейродегенерація, гангліонарні клітини, амакрінові клітини, горизонтальні клітини.

Актуальність. За даними Міжнародної діабетичної федерації (IDF) у 2021 році більше півмільярда людей у всьому світі мали цукровий діабет (ЦД), що складало приблизно 10,5% дорослого населення планети [1]. За прогнозом IDF ця цифра зросте до 12,2% у 2045 році. Частим ускладненням ЦД є діабетична ретинопатія (ДР) – одна з головних глобальних причин сліпоти серед людей віком 50 років і старше, яких у 2020 році було зафіксовано 0,86 млн. осіб [2]. У 2020 році кількість дорослих у всьому світі з ДР становила 103,12 млн., до 2045 року прогнозовано зростання цього показника до 160,5 млн. [3].

Сучасна концепція патогенезу ДР включає розуміння, що поряд з розвитком судинних

порушень і пов'язаних з ними ішемії та гіпоксії, у сітківці незалежно прогресують процеси нейродегенерації [4, 5]. Їх розвитку сприяють метаболічні порушення, мітохондріальна дисфункція, зниження ефективності аксональної передачі, нейрозапалення та інші фактори [6].

Нейрофіламенти (NF) є гетерополімерами, що складаються з чотирьох субодиниць – легких (NF-L), середніх (NF-M), важких (NF-H) і α -інтернексину [7]. Вони забезпечують структурну підтримку високоасиметричної геометрії нейронів і, особливо, – радіального розширення мієлінізованих аксонів, що має вирішальне значення для ефективності нервової провідності. Разом з компонентами цитоскелету, включаючи мікротрубочки, нитки

актину та інші волокнисті цитоскелетні елементи, вони створюють регіональну спеціалізовану мережу [7]. Складний патерн фосфорилування та дефосфорилування на кожній субодиниці нейрофіламентів модулює складання ниток, оборот та організацію в цитоскелеті аксонів.

Імуногістохімічно у сітківці дорослого кроля нейрофіламенти (переважно NF-L) виявлялися у горизонтальних клітинах А- та В-типу [8]. У вигляді еозинофільних тілець нейрофіламенти спостерігалися у нейритах горизонтальних клітин внутрішнього ядерного шару та зовнішнього плексиформного шару передньої дорсальної області сітківки у новозеландських білих, японських білих і голландських кроликів [9]. У сітківці мавп експресія нейрофіламентів, як аксонального маркера, була рівномірно розподілена у шарі Генле [10]. У щурів NF-L виявлялися у аксонах гангліонарних клітин та у інших нейронах сітківки [11].

У сітківці кроля NF-H-імунопозитивні волокна були виявлені у плексиформних шарах та шарі нервових волокон [12]. У внутрішньому плексиформному шарі їх ідентифікували як аксони горизонтальних клітин, а закінчення аксонів і волокна в шарі нервових волокон – як аксони гангліозних клітин. Мічені волокна в зовнішньому плексиформному шарі були досить численні та зазвичай дуже тонкими, менш ніж 1 мкм у діаметрі, їх часто можна було простежити на відстані понад 1 мм, оскільки вони проходили збоку через сітківку. Вони були ідентифіковані як аксони амакрінових клітин.

При ДР вміст у сироватці крові пацієнтів з ЦД NF-L і гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) були визначені як біомаркери нейрозапальних і нейродегенеративних процесів [13].

Одним з типових нейрохімічних патогенетичних механізмів, що обумовлює нервову дисфункцію при ДР є дефіцит ГАМК-ергічної медіації [14], що обґрунтовує перспективність застосування модуляторів ГАМК-рецепторів, у тому числі – бензодіазепінів [15-17]. Одним з представників бензодіазепінів є карбацетам, який 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-триме-

тил-1,2,3,4-тетрагідроіндоло [2,3 с]хінолін). Препарат має антиамнестичну, анксиолітичну, антигіпоксичну, протинабрякову і протишокову дію та може вважатися перспективним нейропротектором [16, 17].

Ціль: визначення експресії нейрофіламентів на початкових стадіях розвитку експериментальної ДР та впливу на неї агоністу бензодіазепінових рецепторів карбацетама.

МАТЕРІАЛИ ТА 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 поводження» (№1759-VI від 15.12.2009). Тварин тримали в умовах віварію на стандартному раціоні.

ЦД моделювали на 35 тримісячних щурах-самцях лінії Вістар масою 140-160 г одноразовою внутрішньоочеревиною ін'єкцією стрептозотоцину (50 мг/кг; "Sigma-Aldrich", Китай). Тварин розділили на 3 групи: в 1-й (контроль) вводили 0,5 мл фізіологічного розчину; у 2-й – інсулін (Actrapid НМ Penfill, "Novo Nordisk A/S", Данія) у дозі 30 Од, в 3-й – інсулін комбінували з карбацетамом (5 мг/кг в 0,5 мл фізіологічного розчину). Препарати вводили внутрішньоочеревиною через день, починаючи з 7-го дня після ін'єкції стрептозотоцину, протягом 28 діб.

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-Chek Instant, "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 ротаційному мікротомі HM 325 ("Thermo Shandon", Англія) виготовляли серійні гістологічні зрізи товщиною 2–3 мкм. Імуногістохімічне дослідження проводили з використанням моноклональних мишиних антитіл до NF-H (Neurofilaments 70/200 kDa, Monoclonal antibody, 2F11, "Invitrogen, ThermoFisher Scientific", Waltham, Massachusetts). Зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном. Мікроскопію та фотоархівування проводили із використанням світлооптичних мікроскопів "ZEISS" (Німеччина) з системою обробки результатів "Axio Imager. A2". Оцінку інтенсивності забарвлення 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 (+++) – виска інтенсивність забарвлення [18].

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

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У сітківці щурів на початку експерименту (до моделювання ЦД) NF-H-позитивне забарвлення було виявлено у шарі нервових волокон сітківки у вигляді поздовжніх волокон різної протяжності та у аксональних пагорбах гангліонарних нейронів (рис. 1). Інтенсивність їх забарвлення за шкалою D. Dabbs відповідала 3 балам.

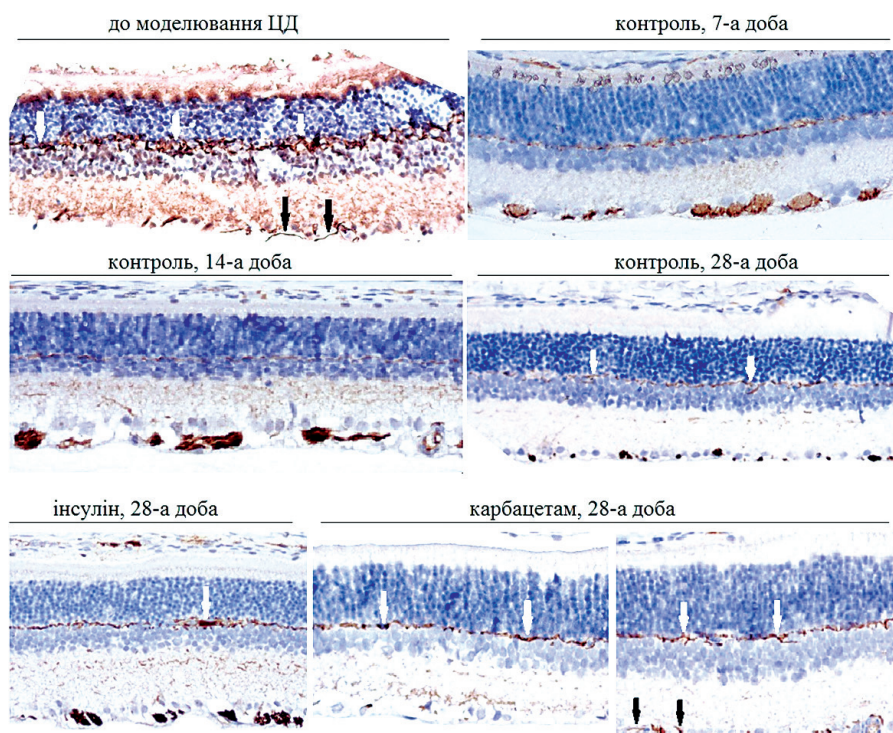


Рис. 1. Мікропрепарати сітківки щурів. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження нейрофіламентів (NF-H), дозabarвлення гематоксиліном; $\times 200$

Примітки:

до моделювання ЦД: чорні стрілочки – повздовжні імунопозитивні волокна у шарі нервових волокон; білі стрілочки – сплетіння імунопозитивних волокон у зовнішньому плексіформному шарі; контроль 28-а доба: білі стрілочки – слабке забарвлення волокон у внутрішньому плексіформному шарі; інсулін, 28-а доба; карбацетам, 28-а доба: білі стрілочки – інтенсивне забарвлення волокон у внутрішньому плексіформному шарі; чорні стрілочки – імунопозитивні волокна у шарі нервових волокон.

У внутрішньому плексіформному шарі імунопозитивні волокна мали невелику протяжність, малий діаметр та хаотичний хід, але частіше розподілялися подовжньо. Морфологія їх відповідала аксонам горизонтальних клітин [12], а інтенсивність забарвлення не перевищувала 2 балів. У зовнішньому плексіформному шарі відмічені численні NF-H-позитивні нервові волокна, які були інтенсивно забарвлені (до 3 балів) та утворювали щільне сплетіння продовж всього шару. За морфологією вони відповідали аксонам амакрінових клітин [12]. Ядерні шари сітківки чіткого NF-H-позитивного забарвлення не проявляли.

У динаміці розвитку ДР на 7-му, 14-ту та 28-му добу у плексіформних шарах сітківки спостерігалось значне зниження інтенсивності імуноспецифічного забарвлення, яке не перевищувало 1 балу за шкалою D. Dabbs. У шарі нервових волокон інтенсивність забарвлення дещо збільшувалося, але воно концентрувалося переважно навколо розширених мікросудин, які мали тенденцію до утворення мікроаневризмів (див. рис. 1). Ці зміни максимальною мірою були виражені на 28-му добу. На цей термін у внутрішньому плексіформному шарі було відмічено зникнення NF-H-позитивного забарвлення.

Введення інсуліну сприяло менш вираженому зниженню інтенсивності імуноспецифічного забарвлення у зовнішньому плексіформному шарі (див. рис. 1), що було підтверджено при оцінці інтенсивності забарвлення NF-H-позитивних нервових волокон (рис. 2).

При введенні карбацетаму імуноспецифічні волокна зовнішнього плексіформного шару мали високу інтенсивність забарвлення, більш чітку структуру нервових сплетінь, волокна яких подекуди продовжувалися у внутрішній ядерний шар (див. рис. 1). Також простежувалися аксони та аксональні пагорби у гангліонарних клітинах шару нервових волокон. Інтенсивність забарвлення плексіформних шарів була суттєво збільшена у порівнянні з контролем та групою з введенням інсуліну ($p < 0,05$; див. рис. 2).

Таким чином, характерна для норми висока інтенсивність NF-H-позитивного забарвлення аксонів плексіформних шарів та шару нервових волокон в процесі розвитку ДР суттєво знижувалася, що могло бути морфологічним відображенням процесів нейродегенерації. Введення інсуліну в комбінації з карбацетамом запобігало діабетичному зниженню експресії мікрофіламентів в сітківці.

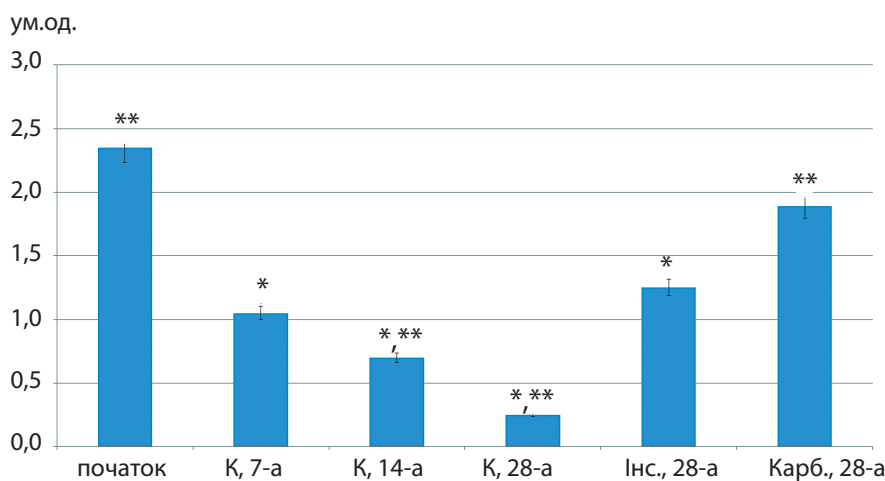


Рис. 2. Інтенсивність NF-H-позитивного забарвлення аксонів зовнішнього плексіформного шару за шкалою D. Dabbs [18]; за віссю ординат – інтенсивність забарвлення (ум.од.), за віссю абсцис – групи тварин: початок – до моделювання ЦД; К – контрольна група; Інс – введення інсуліну, Карб – введення карбацетаму; 7-а, 14-а, 28-а – доба спостереження;

* – $p < 0,05$ у порівнянні з контрольною групою;
 ** – $p < 0,05$ у порівнянні з групою з введенням інсуліну.

ОБГОВОРЕННЯ

Нейрони сітківки є дуже вразливими до діабетогенного ушкодження [5, 6, 14]. Нами було встановлено, що вже на 7-му добу у сітківці виявлялися ознаки нейродегенерації. У шарі нервових волокон зникало NF-H-позитивне забарвлення аксонів гангліонарних клітин; у зовнішньому плексіформному шарі спостерігалося зменшення щільності NF-H-позитивних аксонів горизонтальних клітин та інтенсивності їх забарвлення, у внутрішньому плексіформному шарі суттєво знижувалася інтенсивність NF-H-позитивного забарвлення відростків амакринових клітин, яке зникало на 28-му добу.

Причиною цього явища могла бути активація апоптозу, що за умов аналогічного експерименту було підтверджено у наших попередніх дослідженнях [19, 20]. Дегенерацію амакринових клітин зі зниженням їх оптокінетичної відповіді встановлено у пацієнтів з ранніми проявами діабетичної мікроангіопатії сітківки [21]. За іншими даними при експериментальному діабеті у мишей вже на ранніх етапах відбувається втрата дофамінергічних та холінергічних амакринових клітин [22].

Таким чином, наші та літературні дані однозначно вказували на те, що зниження функціональної активності і апоптична загибель амакринових клітин відбувалася вже на ранніх стадіях ДР.

Крім апоптозу, хронічна гіперглікемія за умов ЦД сприяє активації окисного стресу, нагромадженню кінцевих продуктів глікування (AGEs), а також накопиченню глутамату, що через активацію прозапальних протеїнкіназних шляхів обумовлює мітохондріальну дисфункцію, енергодефіцит, перенавантаження нервових клітин кальцієм, стрес ендоплазматичного ретикулуму і, як загальний наслідок, – загибель нервових елементів сітківки [23, 24]. Відоме патогенне значення мікрооточення нейронів – надмірна активація мікроглії та клітин Мюллера у вигляді реактивного гліозу, що навіть передуює розвитку мікроангіопатії [25, 26].

При експериментальній гіперглікемії було показано ключове значення для формування

змін активності нейронів сітківки порушення гальмівних процесів через пригнічення вивільнення ГАМК на тлі глутаматної ексайтотоксичності, що перезбуджувало гангліонарні клітини [27].

В наших дослідженнях було встановлено ранню (вже на 7-му добу) втрату відростків NF-H-позитивних аксонів у шарі нервових волокон, що також відображало ранні процеси нейродегенерації сітківки. На відміну від гангліонарних та амакринових клітин, більш стійкими до гіперглікемії виявилися горизонтальні нейрони зовнішнього плексіформного шару, однак на 28-му добу NF-H-позитивне забарвлення їх нервових волокон також було суттєво зниженим.

В культивованих нейронах кори миші також відмічено ранню дегенерацію аксонів після ексайтотоксичності, яка була викликана хронічним впливом каїнової кислоти, та була пов'язана з активацією каспази-3 в аксональному відділі [28]. Морфологічно це характеризувалося потовщенням і фрагментацією аксонів, яке мало схожість з Валлеровою дегенерацією, відбувалося руйнування цитоскелета нейронів, в тому числі – деполімеризація мікротрубочок. Також показано швидке (протягом 24-годинного періоду) зникнення нейрофіламентів з аксонів кортикальних нейронів у відповідь на ексайтотоксичну дію, тоді як інші маркери цитоскелету аксонів (такі як бета III-тубулін) залишалися інтактними [29].

В експерименті була показана наявність ГАМК-рецепторів на амакринових та гангліонарних нейронах сітківки [30]. При цьому при експериментальній ДР показано зниження вивільнення ГАМК та дофаміну у сітківці на тлі значного збільшення вмісту глутамату [14, 31]. Посилення імунореактивності глутаматних NMDA-рецепторів спостерігалося в гангліозних, амакринових і біполярних клітинах, а також у внутрішньому і зовнішньому плексіформних шарах сітківки при експериментальному стрептозотоциновому діабеті у щурів [32]. Також виявлено зниження активності та експресії рецепторів ГАМК у сітківці за умов ЦД, тоді як їх блокування прискорювало загибель гангліонарних клітин [33].

У цьому нашому дослідженні виявлений позитивний ефект попередження втрати NF-H-позитивного забарвлення сітківки під впливом інсуліну, що пояснювалося меншою гіперглікемією на тлі його введення. Разом з цим додаткове до інсуліну введення агоністу ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетаму значною мірою попереджало розвиток виявлених ознак нейродегенерації.

У наших попередніх дослідженнях за умов аналогічного експерименту був показаний позитивний ефект карбацетаму при ранній ДР, що полягало у гальмуванні надекспресії GFAP і каспази-3 у сітківці та супроводжувалося запобіганням розвитку реактивного гліюзу, утворенню мікроаневризм та фіброзних проліфератів [19]. Також карбацетам значно зменшував надекспресію гіпоксія-індуцибельного фактору (HIF-1 α) і васкулоендотеліального фактору росту (VEGF) та запобігав розвитку специфічних морфологічних проявів ДР [34]. У даній роботі нами встановлений запобіжний ефект карбацетаму на розвиток нейродегенерації аксональних відростків нейронів сітківки.

Таким чином, відновлення ГАМК-ергічної медіації має комплексний гальмівний ефект на патогенетичні механізми ДР. Відповідно, застосування агоніста бензодіазепінових рецепторів карбацетаму при ДР може бути перспективним патогенетично виправданим напрямком корекції діабетичної нейродегенерації сітківки.

ВИСНОВКИ

До моделювання ДР NF-H-позитивне забарвлення було виявлено у внутрішньому та зовнішньому шарах сітківки у переважно поздовжніх волокнах різної протяжності, які за морфологією відповідали аксонам горизонтальних та амакрінових клітин; а також у волокнах та аксональних пагорбах гангліонарних нейронів.

При розвитку ДР у плексіформних шарах сітківки спостерігалось прогресуюче зниження інтенсивності NF-H-позитивного забарвлення. У шарі нервових волокон інтенсивність забарвлення дещо збільшувалося, але воно

концентрувалося переважно навколо розширених мікросудин, які мали тенденцію до утворення мікроаневризм. На 28-му добу у внутрішньому плексіформному шарі було відмічено зникнення NF-H-позитивного забарвлення.

Введення інсуліну сприяло менш вираженому зниженню інтенсивності NF-H-позитивного забарвлення у зовнішньому плексіформному шарі. Введення карбацетаму запобігало втраті NF-H-позитивного забарвлення у шарах сітківки. Імуноспецифічні волокна зовнішнього плексіформного шару мали високу інтенсивність забарвлення, більш чітку структуру нервових сплетінь, які продовжувалися у внутрішній ядерний шар. Простежувалися аксони та аксональні пагорби у гангліонарних клітинах шару нервових волокон.

Конфлікт інтересів: Авторка заявляє про відсутність конфлікту інтересів.

Джерела фінансування. Дане дослідження виконано за ініціатииви кафедри патофізіології НМУ імені О.О.Богомольця (Київ, Україна) та фінансується за бюджетною програмою МОЗ України, державний реєстраційний номер 0122U001308.

REFERENCES

1. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, Stein C, Basit A, Chan JCN, Mbanya JC, Pavkov ME, Ramachandaran A, Wild SH, James S, Herman WH, Zhang P, Bommer C, Kuo S, Boyko EJ, Magliano DJ. 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. DOI: 10.1016/j.diabres.2021.109119.
2. GBD 2019 Blindness and Vision Impairment Collaborators; Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: the Right to Sight: an analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet Glob Health.*

- 2021 Feb;9(2):e144-e160. DOI: 10.1016/S2214-109X(20)30489-7.
3. Teo ZL, Tham YC, Yu M, Chee ML, Rim TH, Cheung N, Bikbov MM, Wang YX, Tang Y, Lu Y, Wong IY, Ting DSW, Tan GSW, Jonas JB, Sabanayagam C, Wong TY, Cheng CY. Global Prevalence of Diabetic Retinopathy and Projection of Burden through 2045: Systematic Review and Meta-analysis. *Ophthalmology*. 2021 Nov;128(11):1580-1591. DOI: 10.1016/j.ophtha.2021.04.027.
 4. Ren J, Zhang S, Pan Y, Jin M, Li J, Luo Y, Sun X, Li G. Diabetic retinopathy: Involved cells, biomarkers, and treatments. *Front Pharmacol*. 2022 Aug 9;13:953691. DOI: 10.3389/fphar.2022.953691.
 5. Van de Kreeke JA, Darma S, Chan Pin Yin JMPL, Tan HS, Abramoff MD, Twisk JWR, Verbraak FD. The spatial relation of diabetic retinal neurodegeneration with diabetic retinopathy. *PLoS One*. 2020 Apr 16;15(4):e0231552. DOI: 10.1371/journal.pone.0231552.
 6. Ou GY, Lin WW, Zhao WJ. Neuregulins in Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci*. 2021 Apr 9;13:662474. DOI: 10.3389/fnagi.2021.662474.
 7. Yuan A, Rao MV, Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017 Apr 3;9(4):a018309. DOI: 10.1101/cshperspect.a018309.
 8. Löhrlke S, Brandstätter JH, Boycott BB, Peichl L. Expression of neurofilament proteins by horizontal cells in the rabbit retina varies with retinal location. *J Neurocytol*. 1995 Apr;24(4):283-300. DOI: 10.1007/BF01186541.
 9. Kawasako K, Oshikata T, Kanno T, Hamamura M. Neurofilament Accumulation in Rabbit Retinas. *J Comp Pathol*. 2015 Nov;153(4):283-6. DOI: 10.1016/j.jcpa.2015.07.002. Epub 2015 Aug 17. PMID: 26292767.
 10. Ikeda T, Nakamura K, Oku H, Horie T, Kida T, Takai S. Immunohistological Study of Monkey Foveal Retina. *Sci Rep*. 2019 Mar 27;9(1):5258. DOI: 10.1038/s41598-019-41793-y.
 11. Nadal-Nicolás FM, Galindo-Romero C, Lucas-Ruiz F, Marsh-Amstrong N, Li W, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Pan-retinal ganglion cell markers in mice, rats, and rhesus macaques. *Zool Res*. 2023 Jan 18;44(1):226-248. DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2022.308.
 12. Völgyi B, Bloomfield SA. Axonal neurofilament-H immunolabeling in the rabbit retina. *J Comp Neurol*. 2002 Nov 18;453(3):269-79. DOI: 10.1002/cne.10392.
 13. Hernández C, Simó-Servat O, Porta M, Grauslund J, Harding SP, Frydkjaer-Olsen U, García-Arumí J, Ribeiro L, Scanlon P, Cunha-Vaz J, Simó R; European Consortium for the Early Treatment of Diabetic Retinopathy (EUROCONDOR). Serum glial fibrillary acidic protein and neurofilament light chain as biomarkers of retinal neurodysfunction in early diabetic retinopathy: results of the EUROCONDOR study. *Acta Diabetol*. 2023 Jun;60(6):837-844. DOI: 10.1007/s00592-023-02076-1.
 14. Eggers ED. Visual Dysfunction in Diabetes. *Annu Rev Vis Sci*. 2023 May 10. DOI: 10.1146/annurev-vision-111022-123810.
 15. Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Saad HM, Batiha GE. Benzodiazepines in Alzheimer's disease: beneficial or detrimental effects. *Inflammopharmacology*. 2023 Feb;31(1):221-230. DOI: 10.1007/s10787-022-01099-4.
 16. Wan H, Warburton EC, Zhu XO, Koder TJ, Park Y, Aggleton JP, Cho K, Bashir ZI, Brown MW. Benzodiazepine impairment of perirhinal cortical plasticity and recognition memory. *Eur J Neurosci*. 2004 Oct;20(8):2214-24. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2004.03688.x.
 17. Kmet OG, Ziablitzev 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.
 18. Dabbs D. *Diagnostic Immunohistochemistry, 4th Edition Theranostic and genomic applications*. 2014. 960 p.
 19. 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. <https://doi.org/10.15407/fz69.06.033>. in Ukrainian.

20. Ziablitsev SV, Vodianyuk VV. Retinal apoptosis and the effect of tyrosine kinase inhibition in experimental diabetes. *Journal of Ophthalmology (Ukraine)*. 2023;5(514):34-40. DOI: 10.31288/oftalmolzh202353440.
21. 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. DOI: 10.3390/jcm10184035.
22. Gastinger MJ, Singh RS, Barber AJ. Loss of cholinergic and dopaminergic amacrine cells in streptozotocin-diabetic rat and Ins2Akita-diabetic mouse retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Jul;47(7):3143-50. DOI: 10.1167/iops.05-1376.
23. 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. DOI: 10.1167/iops.17-21873.
24. Lynch SK, Abramoff MD. Diabetic retinopathy is a neurodegenerative disorder. *Vision Res*. 2017 Oct;139:101-107. DOI: 10.1016/j.visres.2017.03.003.
25. Simó R, Stitt AW, Gardner TW. Neurodegeneration in diabetic retinopathy: does it really matter? *Diabetologia*. 2018 Sep;61(9):1902-1912. DOI: 10.1007/s00125-018-4692-1.
26. Pitale PM, Gorbatyuk MS. Diabetic Retinopathy: From Animal Models to Cellular Signaling. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 27;23(3):1487. DOI: 10.3390/ijms23031487.
27. Eggers ED, Carreon TA. The effects of early diabetes on inner retinal neurons. *Vis Neurosci*. 2020 Sep 16;37:E006. DOI: 10.1017/S095252382000005X.
28. King AE, Southam KA, Dittmann J, Vickers JC. Excitotoxin-induced caspase-3 activation and microtubule disintegration in axons is inhibited by taxol. *Acta Neuropathol Commun*. 2013 Sep 9;1:59. DOI: 10.1186/2051-5960-1-59.
29. Chung RS, McCormack GH, King AE, West AK, Vickers JC. Glutamate induces rapid loss of axonal neurofilament proteins from cortical neurons in vitro. *Exp Neurol*. 2005b Jun;193(2):481-8. DOI: 10.1016/j.expneurol.2005.01.005.
30. Sawant A, Ebbinghaus BN, Bleckert A, Gamlin C, Yu WQ, Berson D, Rudolph U, Sinha R, Hoon M. 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. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.108858.
31. Fang W, Huang X, Wu K, Zong Y, Yu J, Xu H, Shi J, Wei J, Zhou X, Jiang C. 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. DOI: 10.3389/fnmol.2022.930599.
32. 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. DOI: 10.1016/j.brainres.2004.05.055.
33. 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. DOI: 10.1016/j.exer.2008.01.019.
34. Ziablitsev 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. DOI: 10.15407/ubj95.06.021.

EXPRESSION OF NEUROFILAMENTS IN THE RETINA IN EXPERIMENTAL DIABETIC RETINOPATHY AND THE INFLUENCE OF THE BENZODIAZEPINE RECEPTOR AGONIST CARBACETAM

Zhupan D.B.

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

zsv1965@gmail.com

Background. One of the typical neurochemical pathogenetic mechanisms causing the dysfunction of retinal neurons in diabetic retinopathy (DR) is a deficiency of GABA-ergic mediation. To some extent, this justifies the prospect of using GABA receptor modulators, including benzodiazepines.

Aim: To determine the expression of neurofilaments in the initial stages of the experimental DR development and the influence of the benzodiazepine receptor agonist Carbacetam.

Materials and methods. DR was modeled in 35 three-month-old male Wistar rats by a single injection of streptozotocin (50 mg/kg; Sigma-Aldrich, Co, China). The rats were divided into 3 groups: control, with the introduction of Insulin (30 Units; Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark) and with the introduction of Insulin and Carbacetam (5 mg/kg). NF-H neurofilaments (ThermoFisher Scientific, USA) were detected in the retina by immunohistochemistry.

Results. Before DR modeling, NF-H-positive staining was detected in the inner and outer layers of the retina in mainly longitudinal fibers of different lengths, which corresponded to the axons of horizontal and amacrine cells; as well as in fibers and axonal hills of ganglion neurons. In the dynamics of the DR development in the plexiform layers of the retina, a progressive decrease in the intensity of staining was observed. In the optic fiber layer, staining was concentrated around dilated microvessels that tended to form microaneurysms. On the 28th day, NF-H-positive staining disappeared in the inner plexiform layer. Administration of Insulin with Carbacetam prevented the loss of NF-H-positive staining in the layers of the retina.

Conclusion. The use of the benzodiazepine receptor agonist Carbacetam may be a promising direction for the correction of retinal neurodegeneration in DR.

Key words. Diabetes mellitus, GABA, neurodegeneration, ganglion cells, amacrine cells, horizontal cells.