

РЕАКТИВНИЙ ГЛІОЗ СІТКІВКИ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ДІАБЕТИЧНОЇ РЕТИНОПАТІЇ ТА ВПЛИВ НА НЕЇ ГАЛЬМУВАННЯ КЛІТИННИХ ПРОТЕЇНКІНАЗ

Усенко К.О. <https://orcid.org/0000-0001-9907-6109>

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

usenko1205@gmail.com

Ціль: визначити вплив інгібітору клітинних протеїнказ сорафенібу на розвиток реактивного гліозу сітківки при експериментальній діабетичній ретинопатії.

Матеріали та методи. У щурів-самців лінії Wistar моделювали діабетичну ретинопатію шляхом одноразового введення стрептозотоцину (50 мг/кг; Sigma-Aldrich, Co, China). Щурів було розподілено на 3 групи: контрольна, з введенням інсуліну (30 Од; NovoNordiskA/S, Bagsvaerd, Denmark) і з введенням інсуліну і сорафенібу (55 мг/кг; Cir-la, India). Імуногістохімічне дослідження проводили з використанням моноклональних антитіл проти GFAP ("ThermoFisher Scientific", США). Визначення вмісту GFAP у лізатах тканини сітківки проводили методом імуноблотингу.

Результати. При розвитку діабетичної ретинопатії було відмічено прогресуюче збільшення експресії GFAP у астроцитах шару нервових волокон та клітинах Мюллера. Також збільшувався вміст GFAP у тканинах сітківки, що підтверджувало розвиток реактивного гліозу. Лікування тварин інсуліном спряло меншій інтенсивності GFAP-позитивного забарвлення клітин та знижувало вміст GFAP у сітківці. Додавання сорафенібу попереджало діабетогенний реактивний гліоз сітківки.

Висновки. Попередження активації астроцитів і клітин Мюллера сітківки при експериментальній діабетичній ретинопатії свідчило на користь можливого використання цього препарату для лікування ранніх стадій діабетогенного пошкодження сітківки.

Ключові слова: діабетична ретинопатія, гліоз, астроцити, клітини Мюллера, GFAP, сорафеніб.

Актуальність. До макрогліальних клітин сітківки відносяться астроцити і клітини Мюллера, які забезпечують трофічну та метаболічну функцію нейронів, відповідають за підтримку гомеостатичного середовища, беруть участь у формуванні гематоретинального бар'єру (ГРБ) [1]. Макроглія підтримує гомеостаз позаклітинних іонів і нейромедіаторів, має важливе значення для обробки інформації в нейронних ланцюгах, бере участь у метаболізмі глюкози в сітківці та у видаленні відходів метаболізму, регулює місцевий кровотік, відіграє фундаментальну роль у місцевій імунній відповіді та захищає нейрони від окисного пошкодження [2].

Астроцити сітківки у людини, щурів і мишей знаходяться у шарі нервових волокон і шарі гангліонарних клітин та мають зіркоподібну форму [3]. На відміну від гангліонарних клітин, астроцити не поширюють потенціали дії вздовж своїх відростків, однак астроцити та клітини Мюллера демонструють регульоване підвищення внутрішньоклітинного вмісту кальцію, що є формою їх збудливості [4].

У відповідь на пошкодження сітківки як астроцити, так і клітини Мюллера піддаються реактивному гліозу, посилюючи регуляцію проміжних ниток, а саме гліальних фібрилярних кислотних білків (GFAP), віментину і нестину [5]. Показано, що ця реакція опосередкована через протеїназний шлях сигнального білку та активатора транскрипції STAT3.

Реактивний гліоз є типовою відповіддю макроглії на пошкодження, але дискусабельним є питання про його роль – нейропротекторну або цитотоксичну та пошкоджувальну [6]. Обґрунтованою є думка про те, що за умов пошкодження можуть існувати два типи реактивних астроцитів, відомі як A1 та A2 [7]. Фенотип A1 є прозапальним та нейротоксичним і реалізується через активацію ядерного фактору капа-В (NF- κ B), тоді як фенотип A2 корисний для виживання нейронів і реалізується через шляхи STAT3 та/або PI3K/Akt [8].

Реактивний гліоз був описаний при різних патологічних станах сітківки, включаючи цукровий діабет (ЦД), вікову макулярну дегенерацію, глаукому, відшарування сітківки

або пігментний ретиніт [2]. Активація астроцитів і реактивний гліоз поряд з нейродегенерацією спостерігалися у макак-резусів при моделюванні цукрового діабету як 1-го, так і 2-го типів на ранній стадії діабетичної ретинопатії (ДР) [9]. Завдяки важливості астроцитів і клітин Мюллера для підтримки нервово-судинної структури та функції сітківки, вважається, що їх дисфункція при ЦД може бути вирішальним фактором патології ДР [10]. Широка участь макроглії в захворюваннях сітківки вказує на те, що ці клітини є потенційними мішенями для розробки нових напрямків таргетної терапії [2].

Перспективним напрямком лікування ДР є застосування інгібіторів рецепторних претеїназ (ІПК) [11]. У попередніх дослідженнях нами показана гіпоглікемічна дія мультикіназного ІПК сорафенібу при моделюванні ЦД 1-го (введення стрептозотоцину) і 2-го типів (тривала жирова дієта з введенням низьких доз стрептозотоцину) [12].

Сорафеніб (BAY-43-9006, Nexavar®, Bayer) – протипухлинний препарат, що використовується для лікування неоперабельної гепатоцелюлярної карциноми та прогресуючої нирково-клітинної карциноми [13]. Він є мультикіназним інгібітором проліферації пухлинних клітин *in vitro* через пригнічення внутрішньоклітинних сигнальних кіназ [14].

Таким чином, обґрунтованим є припущення щодо можливості використання ІПК сорафенібу для попередження розвитку ДР при моделюванні ЦД, що, враховуючи здатність препарату до інгібування внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, може включати попередження реактивного гліозу сітківки.

Ціль: визначити вплив інгібітору клітинних протеїназ сорафенібу на розвиток реактивного гліозу сітківки при експериментальній діабетичній ретинопатії.

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.

До дослідження залучено 60 трьохмісячних щурів-самців лінії Wistar вагою 140-160 г. Експериментальний ЦД моделювали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину (50 мг/кг; Sigma-Aldrich, Co, China), розчиненого у холодному 0,1 М цитратному буфері (рН4,5). Протягом 16 годин до виконання ін'єкції тварин не годували, а протягом 24 годин після – поїли 5% розчином глюкози. У подальшому 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 цитратний буфер. Через 3 доби після ін'єкції вміст глюкози у крові тварин, яким вводили стрептозотин був не менше 15 ммоль/л, в жодного щура, яким було введено тільки цитратний буфер, вміст глюкози у крові не перевищував 6,1 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 ЦД з кетозом. У цьому дослідженні тварин спостерігали 3 місяці.

Через 7 діб тварин зі стійкою гіперглікемією (n=60) сліпим рандомним способом розділили на 3 групи по 20 особин. У 1-й групі (контроль) лікування гіперглікемії не проводили. У 2-й групі тваринам через день внутрішньоочеревино вводили інсулін короткої дії (Actrapid HM Penfill, Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark) у дозі 30 Од. Тваринам 3-ї групи вводили інсулін (по схемі 2-ї групи), а також per os щоденно вводили розчин інгібітору протеїнази сорафенібу (200 мг, Cipla, Індія) у дозі 50 мг/кг у вигляді соше.

Тварин виводили з експерименту через 7, 14, 28 діб і 3 місяці у кількості по 5 особин шляхом смертельної ін'єкції тіопенталу (75 мг/кг) та декапітації. Після ін'єкції тіопенталу

та декапітації у тварин проводили двобічну енуклеацію. Для морфологічних досліджень очі занурювали у 10% розчин нейтрального формалінутазаживали 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 проти GFAP ("ThermoFisher Scientific", США). Зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном. Оцінку інтенсивності забарвлення проводили згідно рекомендаціям D. Dabbs (2014) на підставі візуально-аналогової шкали [15]. Оцінка 0 балів відповідала відсутності забарвлення, 1 бал – слабкий, 2 бали – середній і 3 бали – високій інтенсивності забарвлення.

Визначення вмісту GFAP у лізатах тканини сітківки проводили методом імуноблотингу. Електрофорез гомогенатів тканин проводили у поліакриламідному гелі, протеїни з гелю переносили на нітроцелюлозну мембрану за допомогою електроблоту. Мембрани інкубували з моноклональними антитілами до GFAP ("Santa Cruz Biotechnology", США). Напівкількісний аналіз проводили денситометрично, використовуючи програмне забезпечення TotalLab (TL120, "Nonlinear Inc", США). Результати імуноблот-аналізу вмісту виражали в умовних одиницях від контрольної величини оптичної густини відповідної поліпептидної зони на блотограмах, нормованої за вмістом актину в кожному зразку.

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

РЕЗУЛЬТАТИ

Імуногістохімічне забарвлення маркера макроглії GFAP у сітківці інтактних тварин показало його наявність тільки у астроцитах

та їх волокнах, що розташовувалися по внутрішній поверхні сітківки. Як відомо, експресія цього протеїну в нормі відбувається тільки в астроцитах сітківки [2]. У інших шарах специфічного забарвлення виявлено не було. Також можна бачити, що позитивно забарвлені астроцитарні клітини і волокна охоплюють гемокapіляр на внутрішній поверхні сітківки. Інтенсивність забарвлення за шкалою D. Dabbs відповідала 1-2 балам.

За умов розвитку експериментальної ДР відмічено активацію експресії GFAP вже через 7 діб, що було відмічено у шарі нервових волокон повздож внутрішньої поверхні сітківки. Інтенсивність їх забарвлення за шкалою D. Dabbs відповідала 2-3 балам. Вже на цей термін відмічені численні позитивні волокна, які у радіальному напрямку пересікали сітківку. Протягом спостереження (дослідження були проведені на 14-ту, 28-му добу і через 3 місяці) інтенсивність такого забарвлення збільшувалася до 3-4 балів, численні волокна чітко візуалізувалися на всьому протязі внутрішніх шарів сітківки. Характерна їх будова та розташування дозволили ідентифікувати їх як відростки клітини Мюллера [16].

Через 3 місяці спостереження інтенсивність такого забарвлення була максимальною, у всіх випадках можна було бачити численні довгі радіальні волокна, які продовжувалися у шар нервових волокон та щільно охоплювали судини, що в ньому розташовані. У ядерних шарах сітківки помітні були окремі GFAP-позитивні клітини – глія Мюллера. Така картина у контрольній групі відбивала реакцію макроглії сітківки – реактивний гліоз. Як відомо, в нормі клітини Мюллера не експресують GFAP, тоді як при ДР вони набувають такої здатності [2].

Введення інсуліну спряло меншій інтенсивності GFAP-позитивного забарвлення, хоча його клітинний розподіл відповідав такому у контрольній групі. Інтенсивність забарвлення відповідала 1-2 балам. Введення разом з інсуліном сорафенібу ще більшою мірою попереджало активацію експресії GFAP у тканинах сітківки. Отже, можна було

вважати, що діабетогенну реакцію макроглії сітківки – реактивний гліоз суттєво знижувало введення інсуліну разом із сорафенібом.

Необхідно зазначити, що у 2-й та 3-й групах на досліджених термінах (14 і 28 діб) також не було відмічено збільшення експресії GFAP, з чого витікало, що застосоване лікування попереджало притаманну для ДР гіперекспресію GFAP клітинами макроглії сітківки.

Отримані результати підтверджувалися результатами імуноблотингу. Вміст GFAP у тканинах сітківки контрольної групи через 3 місяці був збільшеним у 4,9 рази ($P < 0,05$) у порівнянні з початковими значеннями. Введення інсуліну і, більшою мірою, інсуліну з сорафенібом зменшувало вміст GFAP у тканинах сітківки ($P < 0,05$). На блотограмах візуалізувалася не тільки основна смужка з молекулярною масою 49 kDa, але й менш важкі фрагменти, основний з яких відповідав молекулярній масі 37 kDa. Відомо, що GFAP – це білок, з якого будуються проміжні філаменти цитоскелета астроцитів та деяких інших клітин гліального походження [17]. Його мономерна форма (49 kDa) є досить стабільною структурою, яка синтезується в ході клітинної відповіді, наприклад, реактивного астрогліозу. Перебудови проміжних філаментів відбуваються в ході клітинної відповіді, наприклад реактивного астроцитозу, що відбувається шляхом обмеженого протеолізу їх білків (у тому числі, GFAP в астроцитах). Продукти лімітованого протеолізу з молекулярною масою менше 49 kDa (основний – 37 kDa) теж входять до складу філаментів і екстрагуються разом з основною субодиницею [17]. Отже, накопичення білка проміжних філаментів (GFAP) та його протеоліз – верифіковані ознаки астрогліозу.

Цікаво, що низькомолекулярні поліпептиди GFAP були наявними і в інтактних тварин, що вочевидь, є особливістю організації проміжних філаментів цитоскелета макроглії у сітківці ссавців. Проте їх вміст за умов ЦД був значно більшим (у 4,5 рази; $P < 0,05$) і не відрізнявся від контролю при лікуванні інсуліном і сорафенібом. Це свідчило на

користь попередження протеолізу проміжних філаментів при дії останнього.

Таким чином, розвиток експериментальної ДР супроводжувався вираженим реактивним гліозом у сітківці, який стосувався астроцитів та клітин Мюллера. Надекспресію GFAP знижувало лікування тварин інсуліном, а комбіноване застосування інсуліну і ІПК сорафенібу її фактично попереджувало.

ОБГОВОРЕННЯ

Реактивний гліоз сітківки був описаний як одне з перших патологічних явищ і характерна ознака ДР, який відмічається навіть за відсутності судинних або клінічних симптомів і зберігається протягом усього перебігу захворювання [18].

Гліотичні клітини Мюллера вивільняють безліч проангіогенних, прозапальних і профіброзних факторів, які сприяють васкуляризації та нейродегенерації [18, 19]. Так, утворення ними фактора росту ендотелію судин (VEGF), основного ангіогенного фактора, значно посилюється при ЦД [19]. Показано, що експресія GFAP була значно підвищена у діабетичній сітківці макак-резусів [9], що узгоджувалося з нашими результатами. За умов глікемії клітини Мюллера є джерелом прозапальних цитокінів IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α , що пов'язане із судинною дисфункцією та запаленням [10]. Аберантна проліферація і трансдиференціація клітин Мюллера відіграє ключову роль у формуванні фіброзно-проліферативної тканини при проліферативній ДР, що може спричинити відшарування сітківки [20]. Попередження активації астроцитів і клітин Мюллера сітківки щурів з експериментальною ДР свідчило на користь можливого використання цього препарату для лікування ранніх стадій діабетогенного пошкодження сітківки.

ВИСНОВКИ

1. При розвитку експериментальної діабетичної ретинопатії було відмічено збільшення експресії GFAP у астроцитах

шару нервових волокон та клітинах Мюллера, також збільшувався вміст GFAP у тканинах сітківки, що підтверджувало розвиток реактивного гліозу.

2. Лікування тварин інсуліном сприяло меншій інтенсивності GFAP-позитивного забарвлення клітин та знижувало вміст GFAP у сітківці.
3. Введення разом з інсуліном сорафенібу попереджало діабетогенний реактивний гліоз сітківки, що підтверджувало позитивний вплив препарату на розвиток ДР.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Джерело фінансування. Дане дослідження виконано за ініціативи кафедр офтальмології і патофізіології НМУ імені О.О.Богомольця (Київ, Україна) та фінансується за бюджетною програмою МОЗ України, державний реєстраційний номер 0122U001308.

REFERENCES

1. Kettenmann H, Verkhratsky A. Neuroglia: the 150 years after. Review Trends Neurosci. 2008 Dec;31(12):653-9. DOI: 10.1016/j.tins.2008.09.003.
2. de Hoz R, Rojas B, Ramírez AI, Salazar JJ, Gallego BI, Triviño A, Ramírez JM. Retinal Macrogial Responses in Health and Disease. Biomed Res Int. 2016; 2016:2954721. DOI: 10.1155/2016/2954721.
3. Reichenbach A, Bringmann A. Glia of the human retina. Glia. 2020 Apr;68(4):768-796. DOI: 10.1002/glia.23727.
4. Seifert G, Schilling K, Steinhäuser C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. Nat Rev Neurosci. 2006 Mar;7(3):194-206. DOI: 10.1038/nrn1870.
5. Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. Prog Retin Eye Res. 2016 Mar; 51:1-40. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2015.06.003.
6. Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhäuser C, Lee JM, Parpura V, Hol EM, Sofroniew MV, Verkhratsky A. Astrocytes: a central element in neurological diseases. Acta Neuropathol. 2016

- Mar;131(3):323-45. DOI: 10.1007/s00401-015-1513-1.
7. Liddel SA, Barres BA. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*. 2017 Jun 20;46(6):957-967. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.06.006.
 8. Yoo HS, Shanmugalingam U, Smith PD. Harnessing Astrocytes and Müller Glial Cells in the Retina for Survival and Regeneration of Retinal Ganglion Cells. *Cells*. 2021 May 28;10(6):1339. DOI: 10.3390/cells10061339.
 9. Xia Y, Luo Q, Chen J, Huang C, Jahangir A, Pan T, Wei X, Liu W, Chen Z. Retinal Astrocytes and Microglia Activation in Diabetic Retinopathy Rhesus Monkey Models. *Curr Eye Res*. 2022 Feb;47(2):297-303. DOI: 10.1080/02713683.2021.1984535.
 10. Llorián-Salvador M, Cabeza-Fernández S, Gomez-Sanchez JA, de la Fuente AG. Glial cell alterations in diabetes-induced neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci*. 2024 Jan 18;81(1):47. DOI: 10.1007/s00018-023-05024-y.
 11. Striglia E, Caccioppo A, Castellino N, Reibaldi M, Porta M. Emerging drugs for the treatment of diabetic retinopathy. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2020 Sep;25(3):261-271. DOI: 10.1080/14728214.2020.1801631.
 12. Ziablitzev SV, Usenko J, Dobrovinska OV, Perepelytsa YuV, Andrushchenko VA. [The metabolic effect of cellular protein kinases blockade on the experimental diabetes]. *Fiziol. Zh*. 2024;70(3):16-26 [Ukrainian]. DOI: 10.15407/fz70.03.016.
 13. Abdelgalil AA, Alkahtani HM, Al-Jenoobi FI. Sorafenib. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*. 2019; 44:239-266. DOI: 10.1016/bs.podrm.2018.11.003.
 14. Juan LW, En LM, Hao L, Kai HY, Ju H. Sorafenib regulating ERK signals pathway in gastric cancer cell. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014 Sep;38(2):438-43. DOI: 10.1016/j.etap.2014.07.012.
 15. Dabbs D. *Diagnostic Immunohistochemistry, 4th Edition Theranostic and genomic applications*. 2014. 960 p.
 16. Lindqvist N, Liu Q, Zajadacz J, Franze K, Reichenbach A. Retinal glial (Müller) cells: sensing and responding to tissue stretch. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Mar;51(3):1683-90. DOI: 10.1167/iovs.09-4159.
 17. Tykhomyrov AA, Pavlova AS, Nedzvetsky VS. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP): on the 45th Anniversary of Its Discovery. *Neurophysiology*. 2016;48;54-71. <https://DOI.org/10.1007/s11062-016-9568-8>.
 18. Coughlin BA, Feenstra DJ, Mohr S. Müller cells and diabetic retinopathy. *Vision Res*. 2017 Oct; 139:93-100. DOI: 10.1016/j.visres.2017.03.013. Epub 2017 Sep 5. PMID: 28866025.
 19. Wang J, Xu X, Elliott MH, Zhu M, Le YZ. Müller cell-derived VEGF is essential for diabetes-induced retinal inflammation and vascular leakage. *Diabetes*. 2010 Sep;59(9):2297-305. DOI: 10.2337/db09-1420. Epub 2010 Jun 8. PMID: 20530741; PMCID: PMC2927953.
 20. Wu D, Kanda A, Liu Y, Noda K, Murata M, Ishida S. Involvement of Müller Glial Autoinduction of TGF- β in Diabetic Fibrovascular Proliferation Via Glial-Mesenchymal Transition. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2020 Dec 1;61(14):29. DOI: 10.1167/iovs.61.14.29.

REACTIVE RETINAL GLIOSIS IN EXPERIMENTAL DIABETIC RETINOPATHY AND THE EFFECT OF INHIBITION OF CELLULAR PROTEIN KINASES

Usenko K.O.

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

usenko1205@gmail.com

Aim: to determine the effect of the cellular protein kinase inhibitor sorafenib on the development of reactive retinal gliosis in experimental diabetic retinopathy.

Materials and methods. Diabetic retinopathy was modeled in male Wistar rats by a single injection of streptozotocin (50 mg/kg; Sigma-Aldrich, Co, China). Rats were divided into 3 groups: control, with insulin administration (30 U; NovoNordiskA/S, Bagsvaerd, Denmark) and with insulin and sorafenib administration (55 mg/kg; Cipla, India). Immunohistochemical study was performed using monoclonal antibodies against GFAP ("ThermoFisher Scientific", USA). Determination of GFAP content in retinal tissue lysates was performed by immunoblotting.

Results. With the development of diabetic retinopathy, a progressive increase in GFAP expression was noted in astrocytes of the nerve fiber layer and Müller cells. The content of GFAP in retinal tissues also increased, which confirmed the development of reactive gliosis. Treatment of animals with insulin led to a lower intensity of GFAP-positive staining of cells and reduced the content of GFAP in the retina. The addition of sorafenib prevented diabetogenic reactive gliosis of the retina.

Conclusions. Prevention of activation of astrocytes and Müller cells of the retina in experimental diabetic retinopathy indicated in favor of the possible use of this drug for the treatment of early stages of diabetogenic retinal damage.

Keywords: diabetic retinopathy, gliosis, astrocytes, Müller cells, GFAP, sorafenib.