

# Вплив блокади клітинних протеїназ на експресію у сітківці протеїну S100 при експериментальній діабетичній ретинопатії

К. О. Усенко<sup>1</sup>\*, А. В. С. Е. Ф., С. О. Риков<sup>1,2</sup>, О. О. Дядик<sup>2</sup>, С. В. Зябіцев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна, <sup>2</sup>Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, м. Київ

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

## Ключові слова:

діабетична ретинопатія, реактивний гліоз, астроцити, клітини Мюллера, S100, сорафеніб.

Патологія. 2024. Т. 21, № 3(62). С. 226-231

\*E-mail: usenko1205@gmail.com

Позитивний ефект блокади клітинних протеїназ при цукровому діабеті та діабетичній ретинопатії (ДР) обґрунтовує доцільність з'ясування молекулярних механізмів; тригерна регуляторна роль з-поміж них належить кальцій-зв'язувальним протеїнам S100.

**Мета роботи** – визначити експресію протеїнів S100 у тканинах сітківки та вплив на неї блокади клітинних протеїназ сорафенібом при експериментальній ДР.

**Матеріали і методи.** Діабетичну ретинопатію моделювали у щурів-самців лінії Wistar. Для цього їм одноразово вводили стрептозотокін у дозі 50 мг/кг (Sigma-Aldrich, Co, Китай). Експериментальних щурів поділили на три групи: контрольну; з введенням інсуліну 30 Од (NovoNordiskA/S, Bagsvaerd, Німеччина); з введенням інсуліну та сорафенібу у дозі 50 мг/кг (Cipla, Індія). Під час імуногістохімічного дослідження застосували моноклональні антитіла проти S100 (ThermoFisher Scientific, США).

**Результати.** У разі розвитку експериментальної ДР експресія протеїну S100 істотно збільшувалася в тілах, відростках астроцитів і клітин Мюллера. Останні розташовувалися переважно у внутрішньому ядерному шарі, суттєво збільшувалися за розміром і мали відросткову форму (реактивний гліоз). З мікроаневризмиами, що утворювалися на внутрішній поверхні сітківки, щільно контактували інтенсивно забарвлені S100-позитивні волокна астроцитів. Визначили появу окремих S100-позитивних клітин у зовнішніх шарах сітківки. Лікування тварин інсуліном сприяло зниженню експресії протеїну S100, а застосування сорафенібу запобігло активації експресії білка S100, розвитку ДР, реактивному гліозу й утворенню мікроаневризми на внутрішній поверхні сітківки.

**Висновки.** Описали один із механізмів позитивної дії сорафенібу – пригнічення реактивного гліозу, що запобігло раннім проявам ДР.

## Keywords:

diabetic retinopathy, gliosis, astrocytes, Müller cells, S100, Sorafenib.

Pathologia. 2024;21(3):226-231

## Effect of cellular protein kinases blockade on the s100 retina expression in experimental diabetic retinopathy

K. O. Usenko, S. O. Rykov, O. O. Dyadyk, S. V. Ziablitsev

The positive effect of cellular protein kinases blockade in diabetes and diabetic retinopathy (DR) justifies the need to clarify molecular mechanisms, among which the trigger regulatory role belongs to calcium-binding proteins S100.

**Aim:** to establish the expression of S100 protein in retinal tissues and the effect of cellular protein kinases blockade with Sorafenib on it in experimental DR.

**Materials and methods.** Diabetic retinopathy was modeled in male Wistar rats. For this purpose, they were administered a single injection of streptozotocin at a dose of 50 mg/kg (Sigma-Aldrich, Co, China). Experimental rats were divided into three groups: control; with the administration of insulin 30 U (NovoNordiskA/S, Bagsvaerd, Germany); with the administration of insulin and sorafenib at a dose of 50 mg/kg (Cipla, India). Monoclonal antibodies against S100 (ThermoFisher Scientific, USA) were used during immunohistochemical studies.

**Results.** With the development of experimental DR, the expression of S100 protein significantly increased in the bodies and processes of astrocytes and Müller cells. The latter were mainly located in the inner nuclear layer, significantly increased in size and had a process-like shape (reactive gliosis). Intensely stained S100-positive astrocyte fibers were in close contact with microaneurysms that formed on the retina inner surface. The appearance of individual S100-positive cells in the outer layers of the retina was noted. Treatment of animals with insulin led to a decrease in the expression of the S100 protein, and the use of Sorafenib prevented the activation of the expression of the S100 protein, preventing the development of DR, reactive gliosis, and the formation of microaneurysms on the inner surface of the retina.

**Conclusions.** One of the mechanisms of the positive effect of Sorafenib in DR was discovered – the prevention of reactive gliosis, which prevented early manifestations of DR.

У всьому світі діабетична ретинопатія (ДР) є п'ятою за частотою причиною сліпоти або помірного, тяжкого порушення зору в осіб віком 50 років і більше [1]. При цьому ДР є єдиною причиною сліпоти, що мала глобальне збільшення стандартизованої за віком поширеності у період з 1990 до 2020 року [1]. Нині ДР визначають як тканинспецифічне нейроваскулярне ускладнення цукрового діабету, яке має прогресивний перебіг і характеризується багаторівневим складним патогенезом, що включає дисфункцію та пошкодження нервових елементів і мікросудинне ураження сітківки [2].

Встановлено, що вже перші реакції у відповідь на гіперглікемію залучають гліальні клітини сітківки, які включають мікро- та макроглію – астроцити та клітини Мюллера [2,3]. На перших етапах у відповідь на накопичення аномальних продуктів вуглеводного метаболізму залучається мікроглія й астроцити, розташовані в шарах нервових волокон і гангліонарних клітин сітківки [3]. Їх активація при гіперглікемічному стресі є основним механізмом, що спричиняє нейрозапальні процеси [4]. Пізніше відбувається залучення клітин Мюллера з розвитком реактивного гліозу, маркером якого є гліальний фібрилярний кислий протеїн (GFAP) [5,6]. Реактивний гліоз тісно пов'язаний із підвищеною експресією васкулоендотеліального фактора росту (VEGF) і розвитком хронічного млявого запалення з посиленням проникності судин сітківки та їх проліферацією в ішемічних ділянках [7,8].

Протеїни S100 можуть зв'язувати та буферизувати внутрішньоклітинні іони кальцію і виконують багато регуляторних функцій у клітині [9]. Так, протеїни S100 ініціювали інфільтрацію мікроглії та макрофагів при експериментальній ДР у мишей; крім того, у крові пацієнтів із діабетом вміст протеїнів S100A8 і S100A9 істотно зростає, що прямо відповідало ступеню ДР [10]. Протеїни S100 (S100A7, S100A12, S100A8/A9 та S100B) активують ядерний фактор росту (NFκB) з індукцією прозапальних цитокінів і міграцією нейтрофілів, моноцитів і макрофагів [11]. Протеїн S100A12 опосередковував активацію мікроглії сітківки та запалення при гіперглікемії, стимулював утворення інтерлейкінів (IL-1β та IL-18) у мікроглії [12]. Відомо, що підвищений рівень S100A12 у плазмі пов'язаний із ДР, його вважають біомаркером тяжкості та прогресування цукрового діабету [13].

Розвиток внутрішньоклітинних порушень при діабеті опосередковується активацією протеїнкіназних сигнальних шляхів [14]. Так, при ДР активація шляху мітоген-активована кіназа / позаклітинна сигнал-залежна кіназа (MAPK/ERK) індукує збільшення утворення VEGF [15,16]. Застосування блокади клітинних претеїнкіназ вважають перспективним для підвищення ефективності анти-VEGF терапії при ДР [17]. Комплексний аналіз механізмів неоваскуляризації при ДР дав підстави визначити застосування блокади клітинних протеїнкіназ як новий потенційний варіант імуномодельовальної терапії [18]. У попередніх дослідженнях виявлено гіпоглікемічний ефект мультикіназного блокатора клітинних протеїнкіназ сорафенібу на експериментальних моделях діабету 1, 1, і 2 типу [19].

Отже, позитивний ефект блокади клітинних протеїнкіназ при гіперглікемії та ДР обґрунтовує доцільність з'ясування молекулярних механізмів, триггерна регуляторна роль з-поміж них належить кальцій-зв'язувальним протеїнам S100.

## Мета роботи

Визначити експресію протеїнів S100 у тканинах сітківки та вплив на неї блокади клітинних протеїнкіназ сорафенібом при експериментальній ДР.

## Матеріали і методи дослідження

Під час дослідження дотримувалися норм і принципів, що викладені в Директиві 2010/63 ЄС із захисту тварин, Гельсінській декларації (2008), а також керувалися вимогами Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 15.12.2009 року № 1759-VI. Усіх щурів утримували в умовах віварію на стандартному раціоні.

До дослідження залучили тримісячних щурів-самців лінії Wistar (n = 45), маса тіла – 140–160 г. Експериментальний цукровий діабет і ДР моделювали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину в дозі 50 мг/кг (Sigma-Aldrich, Co, Китай), що розчинений у холодному 0,1 М цитратному буфері (рН 4,5). Рівень глікемії контролювали кожні 3 доби, використовуючи глюкометр та одноразові тест-смужки (ACCU-Chek Instant, Roche, Mannheim, Німеччина); для аналізу кров брали із хвостової вени натще. Для контролю введення стрептозотоцину використали 5 щурів, яким вводили тільки цитратний буфер. Через 3 доби після ін'єкції вміст глюкози у крові тварин, яким вводили стрептозотоцин, становив не менше ніж 15,0 ммоль/л; у щурів, яким введено цитратний буфер, відповідний показник не перевищував 6,1 ммоль/л.

Під час експерименту в щурів зафіксовано виражену полідіпсію, кетон- та глюкозурію. Крім того, у тварин спостерігали істотне зменшення маси тіла. Це дає підстави визначити модель відтворення у щурів інсулінозалежного цукрового діабету з кетозом як адекватну. Період спостереження за експериментальними тваринами становив 3 місяці.

Через 7 діб після введення стрептозотоцину 45 щурів зі стійкою гіперглікемією сліпим випадком способом поділили на три рівні групи (по 15 особин). Тварини 1 групи – контрольні, вони не отримували лікування гіперглікемії. Щурам 2 групи внутрішньоочеревинно вводили інсулін короткої дії (Actrapid HM Penfill, Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Німеччина) у дозі 30 Од через день. Тварини 3 групи одержували інсулін за схемою 2 групи; крім того, їм щоденно *per os* вводили розчин інгібітора протеїнкіназ сорафеніб (200 мг, Cipla, Індія) у дозі 50 мг/кг (саше).

З експерименту щурів по 5 особин поетапно вводили через 7, 28 діб і 3 місяці. Після смертельної ін'єкції тіопенталу (75 мг/кг) та декапітації виконували двобічну енуклеацію. Для наступного морфологічного дослідження очі занурювали в 10 % розчин нейтрального формаліну, заливали в парафін. Із парафінових

блоків на ротаційному мікромомі HM 325 (Thermo Shandon, Велика Британія) виготовляли серійні гістологічні зрізи завтовшки 2–3 мкм.

Імуногістохімічне дослідження здійснили, застосувавши моноклональні мишачі антитіла проти протеїну S100 (ThermoFisher Scientific, США). Додатково зрізи забарвлено гематоксиліном. Для мікроскопічного дослідження й фотоархівування використали світлооптичний мікроскоп ZEISS (Німеччина) із системою обробки результатів Axio Imager A2.

Інтенсивність оцінювали відповідно до рекомендацій D. Dabbs. Згідно з візуально-аналоговою шкалою, 0 балів – забарвлення не виявлено, 1 бал – слабка, 2 бали – середня, 3 бали – висока інтенсивність забарвлення [20]. S100-позитивні клітини у зовнішньому ядерному шарі обрахували, застосувавши об'єкт-мікромметр; результати наведено як кількість клітин на мм<sup>2</sup>.

Для статистичного аналізу результатів дослідження використали програмне забезпечення Statistica 10 (StatSoft, Inc., США). Описова статистика – з обчисленням середніх значень і стандартних похибок; вибіркові середні порівняли, використавши дисперсійний аналіз (ANOVA). Як вірогідні визначали відмінності, якщо  $p < 0,05$ .

## Результати

На початку дослідження проаналізували експресію протеїну S100 у сітківці інтактного щура (рис. 1). Інтенсивне S100-позитивне забарвлення (2–3 бали за шкалою D. Dabbs) мали численні округлі та полігональні клітини внутрішнього ядерного шару, що за морфологією відповідали клітинам Мюллера [21]. Крім того, доволі інтенсивним було забарвлення переплетіння волокон астроцитів вздовж внутрішньої поверхні сітківки – у шарі нервових волокон (рис. 1). У плексиформних шарах виявлено дифузне фонове забарвлення.

Істотні зміни розподілу експресії протеїну S100 відбулися вже на сьому добу після моделювання гіперглікемії (рис. 2).

Більш чітким, ніж в інтактних тварин, було S100-позитивне забарвлення шару нервових волокон на внутрішній поверхні сітківки, що мало вигляд безперервної щільної облямівки (рис. 2 а). Інтенсивне позитивне забарвлення (3 бали за шкалою D. Dabbs) виявлено у гліотичних клітинах Мюллера внутрішнього ядерного шару (рис. 2 а). Ці клітини чітко візуалізувалися та мали полігональну відросткову форму (рис. 2 б). S100-позитивне забарвлення виявили також і у відростках цих клітин, що продовжувалися у зовнішній ядерний шар, де мали переважно радіальне спрямування (рис. 2 б). Крім того, позитивно забарвлювалася межева зона зовнішнього ядерного шару та внутрішнього сегмента фоторецепторів (рис. 2 б).

За дизайном експерименту з сьомого дня тварин поділяли на 3 групи та починали лікування. На 28 добу групи відрізнялися (рис. 3). Так, у контрольній групі загалом зберігалися зміни, що визначені на попередньому терміні, з тенденцією до збільшення інтенсивності S100-позитивного забарвлення (3–4

бали за шкалою D. Dabbs). Втім, виявлено й особливість – поодинокі округлі імунопозитивні клітини у зовнішньому ядерному шарі (рис. 3 а). Ці клітини мали меншу інтенсивність забарвлення (до 2 балів за шкалою D. Dabbs). Відомо, що за умов гіперглікемії клітини Мюллера трансдиференціюються у мезенхімальні клітини та мігрують у ядерні шари сітківки з утворенням клітинних проліфератів [2]. Можливо, під час спостереження зафіксовано саме перший етап цієї міграції.

У разі введення інсуліну (рис. 3 б) виявлено тенденцію до зменшення щільності S100-позитивних клітин Мюллера у внутрішньому ядерному шарі, хоча інші прояви істотно не відрізнялися від контролю. Натомість порівняно з контролем комбінована дія інсуліну та сорафенібу спричинила істотне зменшення у цей термін і кількості, й інтенсивності забарвлення клітин Мюллера та їхніх волокон у шарах сітківки (до 2–3 балів за шкалою D. Dabbs; рис. 3 с). Суттєво нижчою була й інтенсивність фонового забарвлення у плексиформних шарах сітківки.

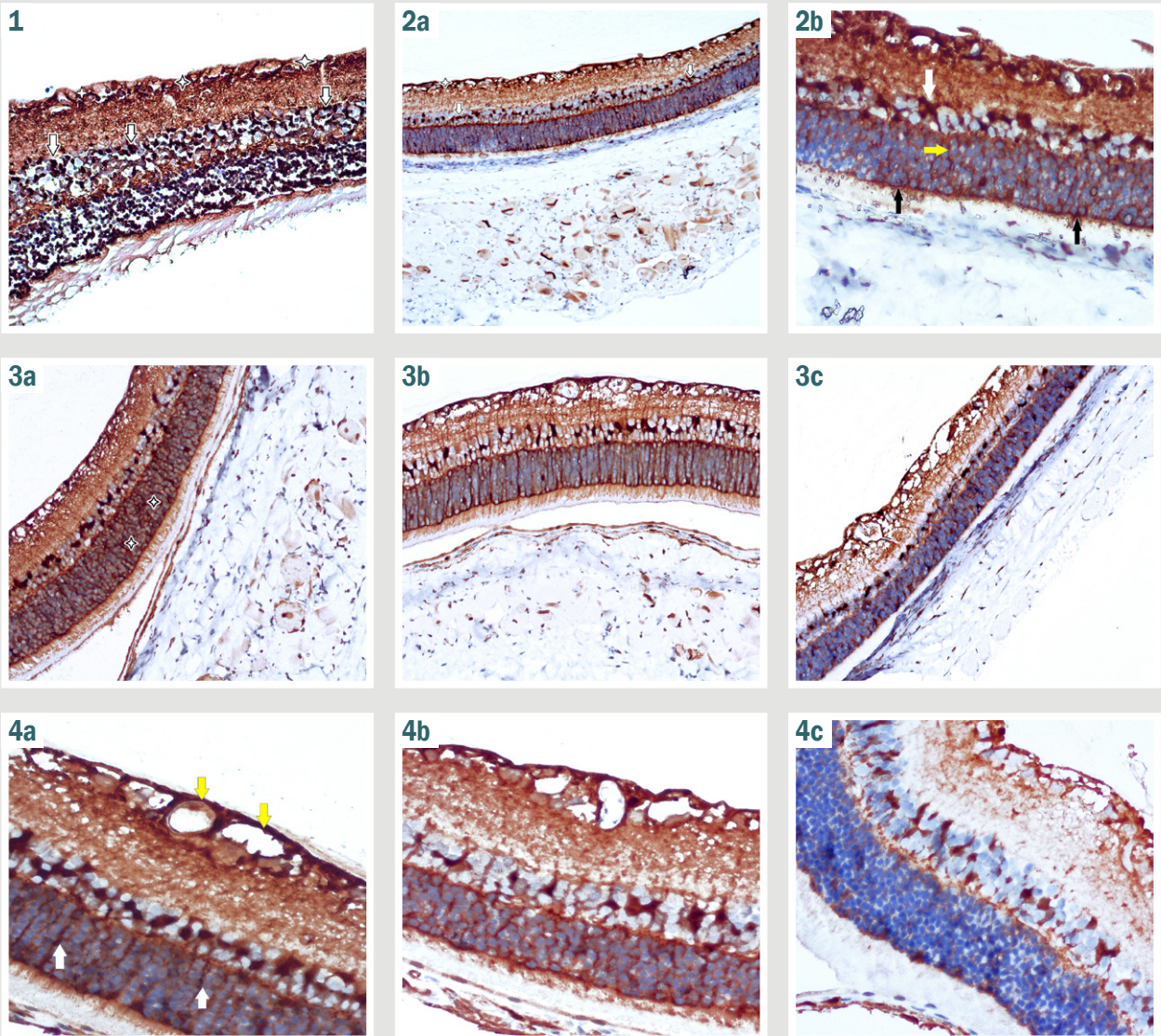
Через 3 місяці спостереження у сітківці виявляли специфічні ознаки ДР, зокрема осередки патологічного ангіогенезу – численні мікроаневризми, що утворювалися на внутрішній поверхні сітківки (рис. 4 а). Судини мали значно розширений просвіт, ущільнену оболонку, що характеризувалася інтенсивним S100-позитивним забарвленням. Крім того, виявлено радіальні S100-позитивні волокна не тільки у зовнішньому ядерному, але й у внутрішньому плексиформному шарі (рис. 4 а). Інтенсивність фонового забарвлення шарів сітківки залишалася доволі високою (до 2 балів за шкалою D. Dabbs).

У групі тварин, які одержували інсулін, наведені прояви були менш виражені (рис. 4 б). Як і в контролі, S100-позитивне забарвлення мали клітини у внутрішньому ядерному шарі та їхні відростки, спрямовані в довколишні шари сітківки. Зазначимо, що їхні кількість та інтенсивність забарвлення менші, ніж у контрольній групі.

У групі щурів, яким вводили інсулін і сорафеніб, загальна інтенсивність специфічного забарвлення найменша (рис. 4 с). Кількість S100-позитивних клітин Мюллера істотно менша, ніж в інших групах, інтенсивність їхнього забарвлення не перевищувала 1–2 балів за шкалою D. Dabbs. За морфологією вони були схожі на S100-позитивні клітини, що виявлені у цьому шарі в інтактних тварин. Не забарвлювалися, а отже й не візуалізувалися відростки клітин Мюллера; на внутрішній поверхні сітківки не виявлено мікроаневризм і сплетіння позитивно забарвлених волокон. Наведені зміни свідчили про істотне пригнічення експресії протеїну S100 у сітківці тварин цієї групи, а також на запобігання розвитку гліозу й морфологічних проявів ДР.

Наведені дані підтверджені за результатами кількісного оцінювання щільності й інтенсивності забарвлення S100-позитивних клітин, що візуалізувалися у внутрішньому ядерному шарі (рис. 5).

Для контрольної групи характерне зниження щільності клітин порівняно з інтактними тваринами у 2,4–2,7 раза ( $p < 0,05$ ). Зауважимо, що морфологічно ці клітини мали більший розмір і полігональну форму,



**Рис. 1.** Сітківка інтактного щура. Репрезентативні результати імуногістохімічного виявлення протеїну S100; дозобарвлення гематоксиліном;  $\times 200$ ; білі стрілки: клітини Мюллера у внутрішньому ядерному шарі; білі зірочки: переплетіння волокон вздовж внутрішньої поверхні сітківки.

**Рис. 2.** Сітківка щура на 7 добу. Репрезентативні результати імуногістохімічного виявлення протеїну S100; дозобарвлення гематоксиліном. а:  $\times 200$ ; б:  $\times 400$ ; білі стрілки на а, б: реактивний гліоз клітин Мюллера у внутрішньому ядерному шарі; білі зірочки на а: переплетіння волокон вздовж внутрішньої поверхні сітківки; жовта стрілка на б: відростки клітин Мюллера, що продовжуються у зовнішній ядерний шар; чорні стрілки на б: межа позитивно забарвлена зона зовнішнього ядерного шару та внутрішнього сегмента фоторецепторів.

**Рис. 3.** Сітківка щура на 28 добу. Репрезентативні результати імуногістохімічного виявлення протеїну S100; дозобарвлення гематоксиліном;  $\times 200$ ; а: 1 група (контроль); б: 2 група; с: 3 група; білі зірочки на а: округлі поодинокі клітини у зовнішньому ядерному шарі (ймовірно, клітини Мюллера, що мігрують).

**Рис. 4.** Сітківка щура через 3 місяці. Репрезентативні результати імуногістохімічного виявлення протеїну S100; дозобарвлення гематоксиліном; а, б:  $\times 200$ ; с:  $\times 400$ ; а: 1 група (контроль); б: 2 група; с: 3 група; жовті стрілки на а: мікроаневризми на внутрішній поверхні сітківки; білі стрілки на а: радіальні S100-позитивні волокна у внутрішньому плексіформному шарі.

забарвлювалися їхні відростки. На тлі лікування можна було б очікувати відновлення щільності клітин, однак виявлено наступне зменшення цього показника порівняно з інтактними тваринами: у 5,1 раза – у 2 групі, у 9,7 раза – у 3 групі ( $p < 0,05$  для обох порівнянь).

Інтенсивність забарвлення S100-позитивних клітин внутрішнього ядерного шару в контрольній групі протягом спостереження порівняно з інтактними тваринами значущо збільшувалася – в 1,4–1,6 раза,  $p < 0,05$ ). Введення інсуліну не змінювало цей

показник – він залишався на вихідному рівні; застосування разом з інсуліном сорафенібу спричиняло його значуще зменшення (до 72,5 % від рівня інтактних тварин,  $p < 0,05$ ).

Отже, якщо в контролі експресія протеїну S100 у клітинах Мюллера зростала, то кількість таких клітин зменшувалася. На тлі лікування тварин зафіксовано зниження і кількості S100-позитивних клітин, й інтенсивності експресії протеїну S100, що більш виражене у разі введення сорафенібу разом з інсуліном.

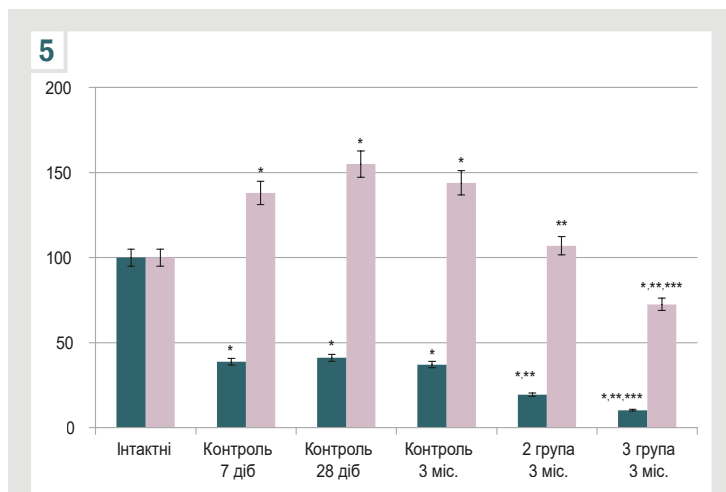


Рис. 5. Середня щільність та інтенсивність забарвлення (у % до рівня інтактних тварин) S100-позитивних клітин у внутрішньому ядерному шарі сітківки в інтактних тварин, у 1 групі (контроль) на 7, 28 доби та через 3 місяці, а також через 3 місяці в експериментальних групах.

## Обговорення

У результаті нашого дослідження визначено тканинний розподіл експресії протеїну S100 у сітківці інтактних щурів. Інтенсивне забарвлення мали тіла, волокна астроцитів шару нервових волокон і численні округлі, полігональні клітини внутрішнього ядерного шару – клітини Мюллера. Відростки клітин Мюллера не мали позитивного забарвлення, і це свідчило про конститутивну соматичну локалізацію протеїну S100.

Вже через 7 діб змодельована гіперглікемія супроводжувалася вираженою активацією експресії протеїну S100 в астроцитах та їхніх волокнах вздовж внутрішньої поверхні сітківки. Це було проявом їх раннього залучення у відповідь на метаболічний стрес. При гіперглікемії саме астроцити експресують численні запальні медіатори, фактори росту, цитокіни й інші фактори, що мають прозапальний ефект і посилюють метаболічне пошкодження [22].

Характерною та специфічною для ранньої ДР була реакція клітин Мюллера. По-перше, вони суттєво збільшувалися за розміром, набували полігональної відросткової форми, а інтенсивне S100-позитивне забарвлення виявляли не тільки в їхніх тілах, але й у відростках, що радіально перетинали сітківку. Ці явища характеризували стан реактивного гліозу сітківки.

По-друге, щільність таких клітин істотно зменшувалася. На нашу думку, це пов'язано з можливістю інтенсивного апоптозу таких клітин, що за умов аналогічної моделі ДР показано в іншому дослідженні [23].

Отже, переважання клітин Мюллера кальцієм, про що свідчило збільшення експресії протеїну S100, могло бути причиною їхньої апоптичної загибелі. Протягом всього спостереження такі зміни підтримувалися, і це свідчило про постійний характер активації S100-позитивної макроглії за умов ДР.

Відомо, що астроцити та клітини Мюллера не генерують потенціали дії вздовж своїх відростків, але демонструють регульоване підвищення внутрішньоклітинного вмісту кальцію, що є специфічною формою їхньої збудливості [24]. При ДР гліотичні клітини

Мюллера мають патологічне значення для індукції нейродегенерації сітківки внаслідок порушення ними депонування калію, метаболізму глутамату та надмірної експресії ангіогенних факторів [25]. Є підстави вважати, що саме надмірна активація глії призводить до розвитку та прогресування діабетичної нейродегенерації сітківки [26]. Відповідно, встановлене збільшення експресії кальцій-зв'язувальних протеїнів S100 свідчило про їхню активацію та залучення до механізмів патогенезу ДР.

Третя особливість експресії протеїну S100 у діабетичній сітківці – поява позитивно забарвлених поодиноких округлих клітин у зовнішньому ядерному шарі. Ці клітини могли бути клітинами Мюллера, що мігрували по сітківці з утворенням клітинних фіброваскулярних проліфератів внаслідок так званого гліально-мезенхімального переходу (трансдиференціації) клітин Мюллера у міофібробласти [27]. Індукторами цього явища є надекспресія трофобластичного фактора росту (TGF- $\beta$ ) та VEGF. Цій процес опосередкований фосфорилуванням мітоген-активованих протеїнкіназ та їх внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, що блокувалося інгібіторами протеїнкіназ [27].

Надекспресія протеїну S100 в астроцитах характеризувала їхню активацію, що без лікування могло супроводжуватися утворенням астроцитами VEGF [2,24]. Про це свідчили численні мікроаневризми вздовж внутрішньої поверхні сітківки у тварин контрольної групи.

Введення тваринам інсуліну спричиняло кількісне зменшення проявів ДР, що характерні для контрольної групи, а введення сорафенібу цим проявам запобігало. Сорафеніб (BAY-43-9006, Nexavar®, Bayer) зареєстрований як протипухлинний препарат [28]. За механізмом дії він є мультикіназним інгібітором внутрішньоклітинних сигнальних кіназ, що блокує проліферацію пухлинних клітин [29]. На тлі його застосування у тварин не виявляли морфологічних ознак розвитку ДР, зокрема осередків патологічного ангіогенезу та міграції клітин Мюллера. Виходячи з розуміння патологічної ролі внутрішньоклітинних сигнальних каскадів у цих процесах, обґрунтованим є висновок про те, що одним із механізмів дії препарату є гальмування активації макроглії та експресії протеїнів S100, яке запобігало надмірній активації та загибелі астроцитів і клітин Мюллера.

Результати дослідження можна вважати обґрунтованими для наступного вивчення механізмів позитивної дії сорафенібу при ДР, а його застосування – патогенетично обґрунтованим для запобігання виникненню ранніх проявів ДР.

## Висновки

1. При розвитку експериментальної ДР експресія протеїну S100 у гліотичних астроцитах і клітинах Мюллера значно зростала й у тілах клітин, і в їхніх відростках.

2. Навколо мікроаневризм, що утворювалися на внутрішній поверхні сітківки, S100-позитивні волокна астроцитів утворювали щільні скупчення. Виявлено окремі S100-позитивні клітини у зовнішніх шарах сітківки.

3. Введення щурам інсуліну спричиняло зниження експресії протеїну S100, а застосування сорафенібу гальмувало експресію білка S100, запобігало розвитку ДР, реактивного гліозу і мікроаневризм.

**Перспективи подальших досліджень.** У попередніх дослідженнях показано гіпоглікемічний ефект сорafenібу при моделюванні цукрового діабету 1, 1, 2 типу. Відповідно, у наступному дослідженні доцільним є з'ясування реакції S100-позитивної глії за умов моделювання цукрового діабету 2 типу із застосуванням тривалої жирової дієти.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

**Conflicts of interest:** authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 15.10.2024

Після доопрацювання / Revised: 25.11.2024

Схвалено до друку / Accepted: 05.12.2024

### Відомості про авторів:

Усенко К. О., канд. мед. наук, доцент каф. офтальмології та оптометрії післядипломної освіти, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0001-9907-6109

Риков С. О., д-р мед. наук, професор, зав. каф. офтальмології та оптометрії післядипломної освіти, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ; чл.-кор. НАМН України, заслужений лікар України.

ORCID ID: 0000-0002-3495-7471

Дядик О. О., д-р мед. наук, професор, зав. каф. патологічної анатомії, Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, м. Київ.

ORCID ID: 0000-0002-9912-4286

Зябілицев С. В., д-р мед. наук, професор, зав. каф. патофізіології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-5309-3728

### Information about the authors:

Usenko K. O., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Ophthalmology and Optometry of Postgraduate Education, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

Rykov S. O., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Ophthalmology and Optometry of Postgraduate Education, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine; Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Ukraine, Honored Doctor of Ukraine.

Dyadyk O. O., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv.

Ziablitzev S. V., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Pathophysiology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

### References

- 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;9(2):e144-e160. doi: 10.1016/S2214-109X(20)30489-7
- Wang W, Lo AC. Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Treatments. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6):1816. doi: 10.3390/ijms19061816
- Mendonca HR, Carpi-Santos R, da Costa Calaza K, Blanco Martinez AM. Neuroinflammation and oxidative stress act in concert to promote neurodegeneration in the diabetic retina and optic nerve: galectin-3 participation. *Neural Regen Res*. 2020;15(4):625-35. doi: 10.4103/1673-5374.266910
- Chang KC, Shieh B, Petrash JM. Role of aldose reductase in diabetes-induced retinal microglia activation. *Chem Biol Interact*. 2019;302:46-52. doi: 10.1016/j.cbi.2019.01.020
- Sundstrom JM, Hernández C, Weber SR, Zhao Y, Dunkleberger M, Tiberti N, et al. Proteomic Analysis of Early Diabetic Retinopathy Reveals Mediators of Neurodegenerative Brain Diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59(6):2264-74. doi: 10.1167/iov.17-23678
- 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. Ukrainian. doi: 10.15407/fz69.06.033
- Xu J, Chen LJ, Yu J, Wang HJ, Zhang F, Liu Q, et al. Involvement of Advanced Glycation End Products in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Cell Physiol Biochem*. 2018;48(2):705-17. doi: 10.1159/000491897
- Ziablitzev 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;95(6):21-9. doi: 10.15407/ubj95.06.021
- Hermann A, Donato R, Weiger TM, Chazin WJ. S100 calcium binding proteins and ion channels. *Front Pharmacol*. 2012;3:67. doi: 10.3389/fphar.2012.00067
- Lim RR, Vaidya T, Gadde SG, Yadav NK, Sethu S, Hainsworth DP, et al. Correlation between systemic S100A8 and S100A9 levels and severity of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr*. 2019;13(2):1581-9. doi: 10.1016/j.dsx.2019.03.014
- Xia C, Braunstein Z, Toomey AC, Zhong J, Rao X. S100 Proteins As an Important Regulator of Macrophage Inflammation. *Front Immunol*. 2018;8:1908. doi: 10.3389/fimmu.2017.01908
- Gao S, Zhang Y, Zhang M. Targeting Novel Regulated Cell Death: Pyroptosis, Necroptosis, and Ferroptosis in Diabetic Retinopathy. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:932886. doi: 10.3389/fcell.2022.932886
- Franco-Martínez L, Gelemanović A, Horvatić A, Contreras-Aguilar MD, Mrjak V, Cerón JJ, et al. The Serum and Saliva Proteome of Dogs with Diabetes Mellitus. *Animals (Basel)*. 2020;10(12):2261. doi: 10.3390/ani10122261
- Saha S, Fang X, Green CD, Das A. mTORC1 and SGLT2 Inhibitors-A Therapeutic Perspective for Diabetic Cardiomyopathy. *Int J Mol Sci*. 2023;24(20):15078. doi: 10.3390/ijms242015078
- Zhang K, Li M, Yin K, Wang M, Dong Q, Miao Z, et al. Hyperoside mediates protection from diabetes kidney disease by regulating ROS-ERK signaling pathway and pyroptosis. *Phytother Res*. 2023;37(12):5871-82. doi: 10.1002/ptr.7993
- Mehrabadi ME, Salemi Z, Babela S, Panahi M. Effect of biochanin A on retina levels of vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Can J Diabetes*. 2018;42(6):639-44. doi: 10.1016/j.cjcd.2018.03.008
- Striglia E, Caccioppo A, Castellino N, Reibaldi M, Porta M. Emerging drugs for the treatment of diabetic retinopathy. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2020;25(3):261-71. doi: 10.1080/14728214.2020.1801631
- Boneva SK, Wolf J, Hajdú RI, Prinz G, Salié H, Schlecht A, et al. In-Depth Molecular Characterization of Neovascular Membranes Suggests a Role for Hyalocyte-to-Myofibroblast Transdifferentiation in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Front Immunol*. 2021;12:757607. doi: 10.3389/fimmu.2021.757607
- Ziablitzev SV, Usenko KO, Dobrovinska OV, Perepelytsa YV, 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
- Dabbs DJ. *Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications*. 5th ed. Elsevier; 2019.
- Aragona M, Briglia M, Porcino C, Mhalhel K, Cometa M, Germanà PG, et al. Localization of Calretinin, Parvalbumin, and S100 Protein in *Nothobranchius guentheri* Retina: A Suitable Model for the Retina Aging. *Life (Basel)*. 2023;13(10):2050. doi: 10.3390/life13102050
- Rübsam A, Parikh S, Fort PE. Role of Inflammation in Diabetic Retinopathy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4):942. doi: 10.3390/ijms19040942
- Ziablitzev SV, Vodnyak VV. Retinal apoptosis and the effect of tyrosine kinase inhibition in experimental diabetes. *Journal of Ophthalmology (Ukraine)*. 2023;5(5):34-40. doi: 10.31288/oftalmolzh202353440
- Seifert G, Schilling K, Steinhäuser C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(3):194-206. doi: 10.1038/nrn1870
- Fletcher EL, Phipps JA, Ward MM, Puthusseray T, Wilkinson-Berka JL. Neuronal and glial cell abnormality as predictors of progression of diabetic retinopathy. *Curr Pharm Des*. 2007;13(26):2699-712. doi: 10.2174/138161207781662920
- Lynch SK, Abràmoff MD. Diabetic retinopathy is a neurodegenerative disorder. *Vision Res*. 2017;139:101-7. doi: 10.1016/j.visres.2017.03.003
- Wu D, Kanda A, Liu Y, Noda K, Murata M, Ishida S. Involvement of Müller Glial Autoinduction of TGF- $\beta$  in Diabetic Fibrovascular Proliferation Via Glial-Mesenchymal Transition. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2020;61(14):29. doi: 10.1167/iov.61.14.29
- Abdelgalil AA, Alkahtani HM, Al-Jenoobi FI. Sorafenib. Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol. 2019;44:239-266. doi: 10.1016/bs.podm.2018.11.003
- Juan LW, En LM, Hao L, Kai HY, Ju H. Sorafenib regulating ERK signals pathway in gastric cancer cell. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014;38(2):438-43. doi: 10.1016/j.etap.2014.07.012