

Експресія ангіотензинперетворювального ензиму-2 (ACE2) при експериментальній діабетичній ретинопатії та вплив на неї блокади клітинних протеїнкіназ

К. О. Усенко^{1, A, B, C, E, F}, С. О. Риков^{1, C, D, E}, О. О. Дядик^{2, B, C, D}, А. О. Тихомиров^{3, B, C, D}, С. В. Зяблицев^{1, C, E, F}

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна, ²Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, м. Київ, ³Інститут біохімії ім. О. В. Паладіна Національної академії наук України, 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

Порушення ренін-ангіотензинової системи (РАС) ока є чинником діабетичних мікросудинних ускладнень. Протидіє ефектам РАС нещодавно відкрита вісь, що включає ангіотензинперетворювальний фермент 2 типу (ACE2) та його продукт ангіотензин 1-7.

Мета роботи – визначити експресію та вміст ACE2 у сітківці при експериментальній діабетичній ретинопатії (ДР) та встановити вплив на них блокади клітинних протеїнкіназ.

Матеріали і методи. Діабетичну ретинопатію моделювали у щурів-самців лінії Wistar. Для цього їм одноразово вводили стрептозотоксин у дозі 50 мг/кг (Sigma-Aldrich, Co, Китай). Експериментальних щурів поділили на чотири групи: контрольну; з введенням інсуліну 30 Од (NovoNordisk A/S, Bagsvaerd, Німеччина); з введенням інгібітора протеїнкіназ сорафенібу (Cipla, Індія) у дозі 50 мг/кг; з введенням інсуліну та сорафенібу. Під час імуноблотингового та імуногістохімічного дослідження застосували моноклональні антитіла проти ACE2 (EMD Millipore Corporation, США).

Результати. Встановлено багаторазове збільшення вмісту ACE2 у діабетичній сітківці: спочатку накопичення його вільних ізоформ, а потім – зв'язування з клітинними білками. Також протягом спостереження визначено збільшення експресії ACE2 у стінках судин, що підтверджувало залучення цього важливого регулятора РАС у патогенез діабетичного пошкодження сітківки. Введення інсуліну знижувало вміст ACE2 на 21 добу та через 2 місяці лікування більшою мірою, ніж його комбіноване введення з сорафенібом або окреме введення сорафенібу. Через 3 місяці зниженню вмісту ACE2, зокрема його високомолекулярних форм, ефективніше сприяло комбіноване введення інсуліну з сорафенібом, ніж окреме введення інсуліну.

Висновки. Встановлено можливу роль збільшення експресії ACE2 в патогенезі діабетичної ретинопатії, а також зафіксовано її зниження під час лікування інсуліном і сорафенібом, що відповідало гальмуванню розвитку морфологічних ознак діабетичної ретинопатії.

Ключові слова:

діабетична ретинопатія, ангіотензинперетворювальний фермент 2, сорафеніб.

Патологія. 2025.

Т. 22, № 2(64).
С. 85-92

Expression of angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) in experimental diabetic retinopathy and influence on it of cellular protein kinases blockade

K. O. Usenko, S. O. Rykov, O. O. Dyadyk, A. O. Tykhomyrov, S. V. Ziablitshev

Disruption of the renin-angiotensin system (RAS) of the eye is a causal factor in diabetic microvascular complications. The effects of RAS are counteracted by a recently discovered axis involving angiotensin-converting enzyme type 2 (ACE2) and its product angiotensin 1-7.

Aim: to determine the expression and content of ACE2 in the retina in experimental diabetic retinopathy (DR) and to establish the effect of blockade of cellular protein kinases on them.

Materials and methods. DR was modeled in male Wistar rats. For this purpose, they were administered streptozotocin once at a dose of 50 mg/kg (Sigma-Aldrich, Co, China). Experimental rats were divided into four groups: control; with the administration of insulin 30 U (NovoNordisk A/S, Bagsvaerd, Germany); with the administration of the protein kinase inhibitor sorafenib (Cipla, India) at a dose of 50 mg/kg; with the administration of insulin and sorafenib. During immunoblotting and immunohistochemical studies, monoclonal antibodies against ACE2 (EMD Millipore Corporation, USA) were used.

Results. A multiple increase in the content of ACE2 in the diabetic retina was established, first the accumulation of its free isoforms, and then binding to cellular proteins. Also, during the observation, an increase in the expression of ACE2 in the vessel walls was noted, which confirmed the involvement of this important RAS regulator in the pathogenesis of diabetic retinal damage. Insulin administration reduced the content of ACE2 after 21 days and 2 months of treatment to a greater extent than its combined administration with sorafenib, or separate administration of sorafenib. After 3 months, the content of ACE2, especially its high-molecular forms, was more effectively reduced by the combined administration of insulin with sorafenib than by separate administration of insulin.

Keywords:

diabetic retinopathy, angiotensin-converting enzyme 2, sorafenib.

Pathologia.

2025;22(2):85-92

Conclusion. The results obtained showed a possible role of increased ACE2 expression in the pathogenesis of DR and revealed its decrease during treatment with insulin and sorafenib, which corresponded to the inhibition of the development of morphological signs of DR.

Діабетична ретинопатія (ДР) – одне з найпоширеніших судинних ускладнень цукрового діабету (ЦД), що нині є однією з основних причин втрати зору в осіб працездатного віку [1].

Ренін-ангіотензинова система (РАС) відіграє важливу роль у регуляції адаптивних реакцій серцево-судинної системи, водно-електролітного обміну та ремоделювання тканин. Її основний медіатор – ангіотензин II, що опосередковує негайні фізіологічні ефекти вазоконстрикції та регуляції артеріального тиску, бере участь у розвитку запалення, ендотеліальної дисфункції, атеросклерозу, гіпертензії та застійної серцевої недостатності [2]. РАС є чинником діабетичних мікросудинних ускладнень, що зумовлює різноманітні реакції тканин, включаючи вазоконстрикцію, запалення, окиснювальний стрес, гіпертрофію та проліферацію клітин, ангіогенез і фіброз [3].

Клінічні та експериментальні моделі ДР та ангіогенезу сітківки, спричиненого гіпоксією, свідчать про активізацію РАС. У сітківці ангіотензин II призводить до вазоконстрикції судин, активує ангіогенез, а також модулює функцію ГАМК-ергічних механізмів амакринових клітин, впливає на глію [4].

Показана ефективність блокади РАС для запобігання виникненню та прогресуванню ДР. Так, інгібітор ангіотензинперетворювального ферменту раміпріл і блокатор рецепторів ангіотензину II телмісартан сприяли зменшенню прогресування ДР і нефропатії у стрептозотоциновій моделі діабету [5]. У Програмі випробувань блокатора РАС кандесартану Національного інституту серця та легенів, (DIRECT); Лондон, Велика Британія) підтверджено, що препарат знижував частоту, але не впливав на прогресування ДР при ЦД 1 типу [6]. За результатами дослідження, що здійснене на базі відділення офтальмології Університетської лікарні в Одесі (Данія) – DIRECT-Protect 2, встановлено: лікування кандесартаном у пацієнтів із ЦД 2 типу може сприяти покращенню перебігу легкої та помірної ДР [7]. Незважаючи на ці позитивні результати, блокатори РАС не можна вважати ретинопротекторами, оскільки ДР може прогресувати до пізньої стадії, навіть коли пацієнт приймає ці препарати.

Відкриття ангіотензинперетворювального ферменту 2 (ACE2) призвело до визначення нової осі РАС, що включає ACE2, його продукт ангіотензин 1-7 та рецептор останнього – Mas [8]. Ця вазопротекторна вісь протидіє проліферативним, фіброзним, прозапальним і гіпертрофічним ефектам класичної осі ACE – ангіотензину II – рецептор ангіотензину II 1 типу. Дисбаланс вазопротекторної та вазоконстрикторної осі РАС в очній тканині може спричинити розвиток і прогресування ДР, а посилення захисної осі ACE2 – ангіотензину (1-7) протидіє ефектам ангіотензину II [8].

Отже, стан РАС і такого важливого її регулятора, як ACE2, може відігравати певну роль у розвитку ДР через вплив на процеси запалення та пошкодження судин сітківки за умов гіперглікемії. У попередніх дослідженнях виявлено позитивний ефект блокади

клітинних протеїназ при експериментальній ДР, що супроводжувалося зменшенням рівня глікемії та втрати маси тіла [9], пригніченням реактивного гліюзу та запобігало виникненню ранніх проявів ДР [10]. На підставі цих даних обґрунтованим вважаємо встановлення впливу блокади клітинних протеїназ на експресію ACE2 у сітківці за умов експериментальної ДР.

Мета роботи

Визначити експресію та вміст ACE2 у сітківці при експериментальній діабетичній ретинопатії та встановити вплив на них блокади клітинних протеїназ.

Матеріали і методи дослідження

Під час дослідження дотримувалися норм і принципів Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986), Директиви Ради Європи 86/609/EEC (1986), Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (2001). Одержано експертний висновок Комісії з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень при Національному медичному університеті імені О. О. Богомольця (протокол від 21.11.2022 року № 164).

До дослідження залучено 65 щурів-самців лінії Wistar віком 3 місяці, маса тіла – 140–160 г. Експериментальний ЦД і ДР моделювали на 60 щурах шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення стрептозотину (50 мг/кг; Sigma-Aldrich, Co, China), розчиненого у холодному 0,1 М цитратному буфері (pH 4,5). Для отримання вихідних даних використано 5 тварин (інтактні). Протягом 16 годин до ін'єкції тварин не годували, а протягом 24 годин після поїли 5 % розчином глюкози. Надалі кожні 3 доби контролювали рівень глікемії за допомогою глюкометра та одноразових тест-смужок (ACCU-Chek Instant, Roche, Mannheim, Germany) у крові, взятої з хвостової вени натще. Через 3 доби після ін'єкції вміст глюкози у крові тварин, яким вводили стрептозотин, становив не менше ніж 15 ммоль/л. Спостереження за щурами тривало 3 місяці.

Через 7 діб тварин зі стійкою гіперглікемією (n = 60) сліпим випадковим способом поділили на 4 групи по 15 особин. У 1 групі (контроль) гіперглікемію не лікували. У 2 групі тваринам через день внутрішньоочеревинно вводили інсулін короткої дії (Actrapid HM Penfill, Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark) у дозі 30 Од. Тваринам 3 групи *per os* щоденно вводили розчин інгібітора протеїназ сорафенібу (Cipla, Індія) у дозі 50 мг/кг (саше). Тваринам 4 групи вводили інсулін (за схемою 2 групи), а також розчин сорафенібу (за схемою 3 групи).

Тварин виводили з експерименту через 7 і 21 добу, 2 і 3 місяці по 5 особин із кожної групи шляхом

смертельної ін'єкції тіопенталу (75 мг/кг). Вміст ACE2 у лізатах тканини сітківки визначали методом імуноблотингу. Зразки тканини витримували у скрапленому азоті, подрібнювали та гомогенізували у 50 ммоль Tris-HCl буфері (pH 7,4) з додаванням інгібіторів фосфатаз і протеаз (Pierce Protease and Phosphatase inhibitor, «ThermoScientific», США, #A32961). Електрофорез проводили у 8 % поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS-PAGE) у камері для вертикального гелі-електрофорезу («BioRad», США). Протеїни з гелю переносили на нітроцелюлозну мембрану за допомогою електроблоту. Мембрани інкубували з моноклональними антитілами до ACE2 (anti-ACE2; clone 4G5.1; Sigma-Aldrich MABN59, replaces MAB5676; виробництва «EMD Millipore Corporation»; Temecula, США). Антитіла до актину (β -actin (loading control), no. MA5-15739, mouse, 1 : 3,000, Invitrogen, США) використовували для його детекції як контроль нанесення протеїну.

Після первинної інкубації мембрани відмивали та обробляли антивидовими вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому (goat anti-rabbit or anti-mouse IgG, Invitrogen, США, cat. nos. G-21234 and 31430, respectively, 1 : 8,000 diluted). Нанівількісний аналіз виконано денситометрично, використано програмне забезпечення TotalLab (TL120, «Nonlinear Inc.», США). Результати імуноблот-аналізу вмісту наведено в умовних одиницях від контрольної величини оптичної густини відповідної поліпептидної зони на блотограмах, що нормована за вмістом актину в кожному зразку.

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 завтовшки 2–3 мкм. Експресію ACE2 оцінювали шляхом імуногістохімічного дослідження з використанням моноклональних антитіл проти ACE2 (anti-ACE2; clone 4G5.1; Sigma-Aldrich MABN59, replaces MAB5676; «EMD Millipore Corporation»; США). Для високотемпературної обробки епітопів антигенів використано цитратний (pH 6,0) і EDTA буфер (pH 8,0). Застосували систему детекції Master Polymer Plus Detection «Master Diagnostica» (Іспанія).

Зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном. Мікроскопічне дослідження та фотоархівування здійснили, застосувавши світлооптичний мікроскоп «ZEISS» (Німеччина) з системою обробки результатів «Axio Imager A2» при збільшенні об'єктів у 5, 10, 20, 40 разів, біокулярної насадки в 1,5 раза та окуляра у 10 разів з камерами (ERc 5s «Carl Zeiss» Primo Star та Axioscam 105 color) і світлооптичного мікроскопа «Olimpus BX 40», що додатково обладнаний цифровою камерою «Olimpus C3030-ADU» і програмним забезпеченням «Olimpus DP-Soft».

Для статистичного аналізу застосували програмне забезпечення Statistica 10 (StatSoft, Inc., США). Описовий статистичний аналіз виконали, обрахувавши середні значення та їхні стандартні похибки. Вибіркові середні порівнювали, виконавши дисперсійний аналіз (ANOVA). Вірогідними вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати

Після введення стрептозотоцину у тварин з усіх груп виникала стійка гіперглікемія з максимальним вмістом глюкози у крові тварин контрольної групи через 3 місяці спостереження ($18,04 \pm 1,41$ ммоль/л). У 2 і 4 групах, де тварин лікували інсуліном (монотерапія або в комбінації з сорафенібом), вміст глюкози значущо менший ($11,04 \pm 1,02$ ммоль/л і $8,38 \pm 0,48$ ммоль/л відповідно, $p < 0,05$). При цьому глікемія вірогідно менша в 4 групі порівняно з 2 групою ($p = 0,02$). У тварин 3 групи, які отримували тільки сорафеніб, вміст глюкози статистично не відрізнявся від контролю ($14,00 \pm 1,06$ ммоль/л, $p = 0,09$), але вірогідно більший за показник тварин, які отримували інсулін ($p < 0,05$). Отже, максимальний гіпоглікемічний ефект зафіксовано у щурів, які отримували комбіноване лікування інсуліном і сорафенібом, мінімальний – у разі введення тільки сорафенібу.

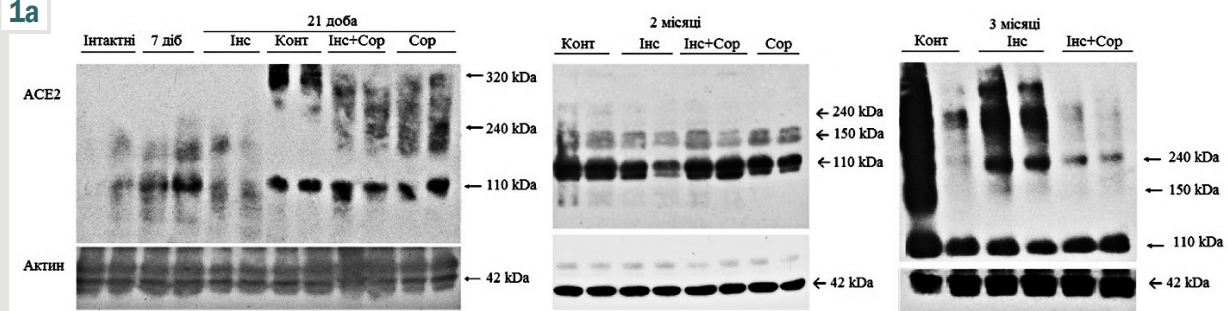
Гіперглікемія, що виникла у тварин після введення стрептозотоцину вже на сьому добу, супроводжувалася ранніми морфологічними проявами ДР. Встановлено зниження щільності клітин у гангліонарному шарі, набряк внутрішнього плексиформного шару, дилатацію капілярів вздовж внутрішньої поверхні сітківки. На 21 добу ці зміни прогресували: виявлено набряк усіх шарів сітківки з дилатацією судин і мікротромбозом у зовнішньому плексиформному шарі, розрідження ядерних шарів сітківки, ділянки ішемії, формування мікроаневризм вздовж внутрішньої поверхні сітківки. Надалі зафіксовано ознаки дисконфлексії сітківки із втратою будови шарів, а також специфічні ознаки ДР – численні мікроаневризми та судинні аномалії на внутрішній поверхні, у зовнішніх шарах – формування клітинних проліфератів.

Визначення рівня ACE2 у тканинах сітківки щурів методом імуноблот-аналізу дало змогу візуалізувати кілька зон специфічного зв'язування протеїну (рис. 1). Найлегші з них мали молекулярну масу менше ніж 110 кДа та відповідали ізоформам інтактного протеїну ACE2 [11]. Більш високомолекулярні поліпептидні зони мали масу 150–320 кДа та відповідали формам ACE2, що утворюють стабільні комплекси з клітинними лігандами. Відповідно, можна було вважати, що фракція ACE2 110 кДа характеризувала рівень синтезованого ензиму *de novo*, а фракція ACE2 >110 кДа – функціонально активну форму цього протеїну у складі PAC тканини.

В інтактних тварин вміст ACE2 110 кДа у сітківці – на рівні слідових концентрацій, а ACE2 >110 кДа не визначено (рис. 1). При розвитку ДР вже на 7 добу показано збільшення у 10,2 раза вмісту ACE2 110 кДа, в 3,9 раза – високомолекулярної фракції ($p < 0,05$ для обох порівнянь).

Через 21 добу вміст ензиму залишався високим, але більший приріст зафіксовано для високомолекулярної фракції (у 10,7 раза порівняно з інтактом), для фракції ACE2 110 кДа – у 5,7 раза ($p < 0,05$ для обох порівнянь). Результати дослідження дали змогу підтвердити збільшення вмісту ACE2 при ДР, при цьому на початку її розвитку більшою мірою активувалася експресія самого ензиму, а пізніше виразніше збільшувалася вміст його зв'язаної з клітинними білками форми, що свідчило про активацію цього ланцюжка PAC.

1a



16

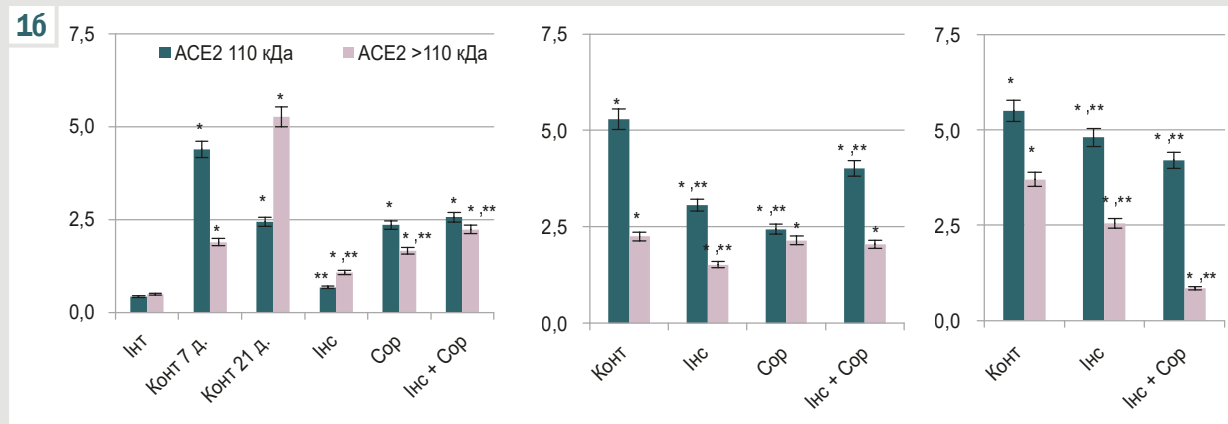


Рис. 1. Співвідношення рівня ACE2 110 / актин, ACE2 >110 / актин у тканині сітківки інтактних тварин (Інт), через 7 і 21 добу, 2 і 3 місяці. **Конт:** неліковані тварини; **Інс:** введення інсуліну; **Сор:** введення сорафенібу; **Інс + Сор:** введення інсуліну з сорафенібом. **А:** репрезентативні блотограми ACE2 та актину; **Б:** результати денситометричного аналізу блотограм (співвідношення із вмістом актину); *: $p < 0,05$ порівняно з інтактними; **: $p < 0,05$ через 21 добу, 2 і 3 місяці порівняно з відповідним контролем.

Лікування сприяло зменшенню на 21 добу вмісту обох фракцій ACE2 при застосуванні інсуліну (у 3,6 раза для ACE2 110 кДа, в 4,9 раза для ACE2 >110 кДа). Застосування сорафенібу окремо або в комплексі з інсуліном не спричиняло зменшення вмісту ACE2 110 кДа, але зумовлювало зменшення ACE2 >110 кДа (у 3,2 раза і 2,4 раза відповідно порівняно з контролем на 21 добу, $p < 0,05$). Ці дані підтвердили зниження зв'язування ензиму з клітинними білками.

Через 2 місяці лікування вміст ACE2 також нижчий, ніж у нелікованому контролі, статистично значущо – для групи із введенням інсуліну (в 1,7 раза для ACE2 110 кДа, в 1,5 раза для ACE2 >110 кДа, $p < 0,05$). При використанні сорафенібу, на відміну від терміну 21 доба, достовірно зниження порівняно з контролем зафіксовано для фракції ACE2 110 кДа (в 1,3–2,2 раза, $p < 0,05$); це свідчило про зниження утворення ензиму.

Через 3 місяці вміст обох фракцій ACE2 порівняно з відповідним контролем істотно зменшений у разі введення інсуліну та сорафенібу (в 1,3 раза для ACE2 110 кДа, у 4,4 раза для ACE2 >110 кДа, $p < 0,05$), ніж при застосуванні тільки інсуліну (в 1,15 та 1,50 раза відповідно, $p < 0,05$). Більший ефект встановлено для високомолекулярної фракції, і тому дійшли висновку про зменшення зв'язування ензиму з клітинними протеїнами, а отже й пригнічення активності РАС.

Через 2 місяці на блотограмах визначено поліпептидні зони на рівні 150 кДа (рис. 1), що відповідають глікозильованій формі ACE2 [11], вміст якої очікувано збільшувався у разі тривалої гіперглікемії. Через 3 місяці ці поліпептидні зони виявлено тільки в окремих пробах тварин із нелікованою ДР.

У результаті дослідження одержали дані, що підтвердили важливі аспекти участі ACE2 у патогенезі ДР та його регуляції за допомогою застосованого лікування. Підвищення рівнів ACE2, зокрема високомолекулярної фракції, свідчило про активацію РАС при розвитку ДР. На ранніх етапах захворювання виявлено переважне збільшення експресії власне ACE2, а на пізніших стадіях підвищення рівня високомолекулярної фракції свідчило про зв'язування ензиму з клітинними протеїнами, що могло бути маркером прогресування хвороби. Лікування інсуліном сприяло зменшенню рівнів обох форм ACE2, тому зробили висновок про його позитивний вплив на регуляцію РАС і поліпшення метаболічного статусу. Сорафеніб, зокрема в комбінації з інсуліном, ефективніше спричиняв зниження рівня високомолекулярної форми ACE2. Це могло бути свідченням зменшення зв'язування ензиму з клітинними лігандами та пригнічення патологічного активування РАС. Виявлені зони на рівні 150 кДа можуть бути індикатором глікозильованого ACE2, рівень якого підвищувався при тривалій гіперглікемії, але зменшувався після відповідної терапії.

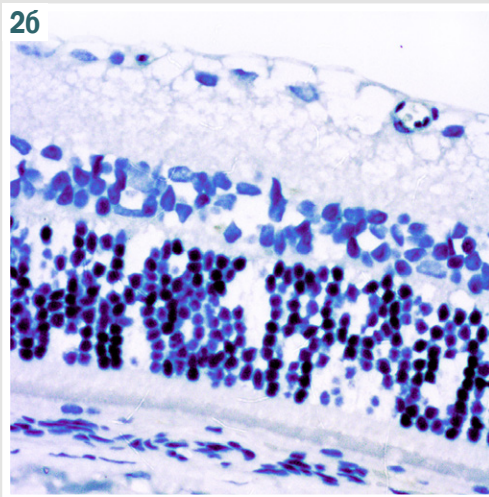
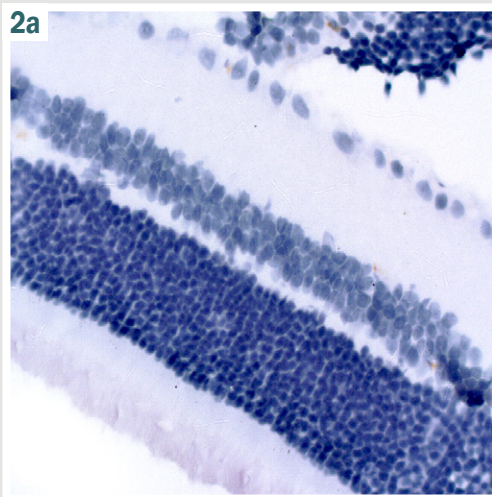


Рис. 2. Мікропрепарат сітківки інтактного щура (а), та у контрольній групі на 7 (б), 21 (в) доби та через 3 місяці (г). Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження ACE2; дозобарвлення гематоксиліном; $\times 400$; білі стрілки: імунопозитивно забарвлені елементи судин сітківки.

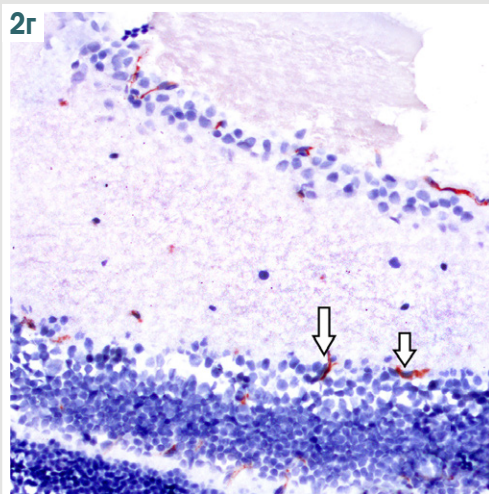
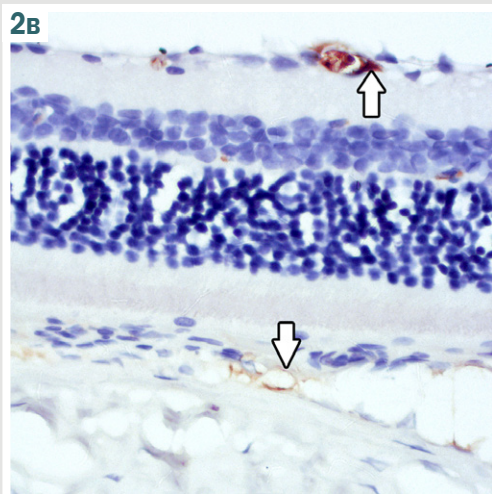
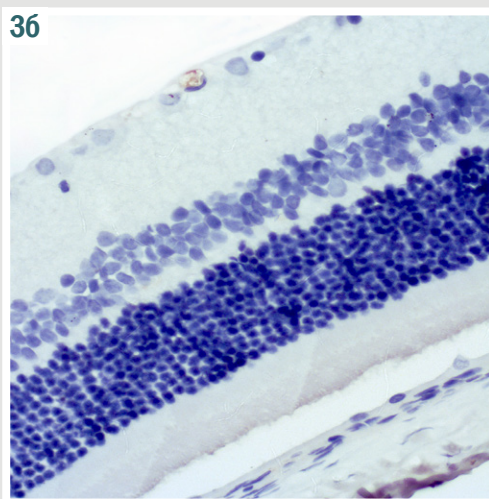
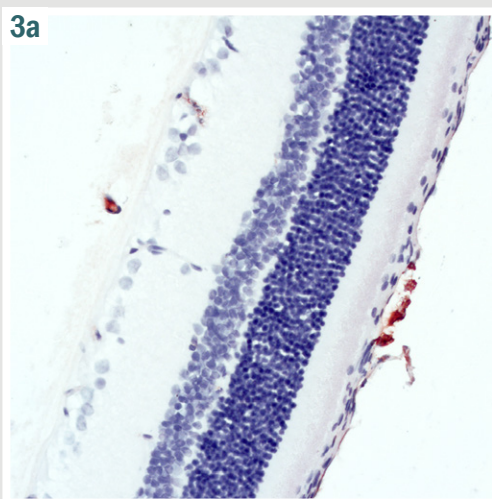


Рис. 3. Мікропрепарат сітківки щурів через 3 місяці на фоні лікування інсуліном і сорафенібом. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження ACE2; дозобарвлення гематоксиліном; а: $\times 200$, б: $\times 400$.



Отже, результати цих досліджень дали змогу встановити, що ACE2 можна використовувати як маркер для моніторингу патологічних змін і ефективності лікування ДР. Крім того, підтверджено важливу роль комбінованої терапії в корекції порушень РАС.

Імуногістохімічне дослідження матеріалу, взятого в інтактних щурів, показало відсутність ACE2-позитив-

ного забарвлення у сітківці (рис. 2а). Через 7 днів на тлі виникнення ранніх ознак ДР (втрата гангліонарних клітин, виражений набряк внутрішніх шарів сітківки, розрідження ядерних шарів) експресію ACE2 не виявлено (рис. 2б). Тільки через 21 день імуногістохімічне дослідження показало ACE2-позитивне забарвлення стінок судин вздовж внутрішньої поверхні сітківки та

у судинному сплетенні (білі стрілки, *рис. 2в*). Через 3 місяці виявлено дисконфлексію шарів сітківки, у зовнішньому ядерному шарі утворювалися клітинні проліферати, що представлені щільно розташованими округлими базофільними клітинами, які інколи виходили за межі цього шару. ACE2-позитивне забарвлення судинних стінок більш виражене, інтенсивно виділялися елементи внутрішнього судинного сплетення сітківки (білі стрілки, *рис. 2в*).

Після комплексного лікування інсуліном і сорафенібом протягом 3 місяців морфологічно визначено суттєво кращий стан сітківки (*рис. 3*).

Шари сітківки зберігали свою звичайну структуру, не виявлено судинні або проліферативні зміни. Подекуди судини сітківки мали ACE2-позитивне забарвлення, інтенсивність якого візуально значно менша, ніж у контролі. Ці спостереження збігалися з результатами імуноблотингу та уточнювали локалізацію ACE2-позитивного забарвлення у судинних стінках сітківки. Експресія ензиму збільшувалася спочатку в судинах внутрішньої поверхні сітківки та судинного сплетення, згодом – внутрішнього сплетення сітківки.

Обговорення

Усі компоненти PAC, зокрема ACE2, у нормі виявляють у сітківці людини та гризунів [12]. При експериментальній ДР рівні мРНК ACE знижені вдвічі, а рівні мРНК ACE2 істотно не змінювалися. Лікування блокатором PAC раміприлом не впливало на експресію гена ACE2. Встановлено, що імунне забарвлення ACE2 локалізоване передусім навколо судин у внутрішньому ядерному шарі; це відповідало результатам нашого дослідження.

За іншими даними, експресія ACE2 у сітківці людей із ДР збільшена, при цьому виявляють значно більшу кількість ACE2-позитивних судин [13]. У цьому дослідженні експресію ACE2 виявлено в багатьох несудинних нейроретинальних клітинах, включаючи шар гангліозних клітин сітківки, внутрішній плексиформний шар, внутрішній ядерний шар і зовнішні сегменти фоторецепторів у зразках і недіабетичної, і діабетичної сітківки. Крім того, збільшена й експресія мембранозв'язаної серинової протеази 2 (TMPRSS2), що виявлена в багатьох нейрональних клітинах сітківки, судинних і периваскулярних клітинах, глії Мюллера [13]. За результатами нашого дослідження, експресію ACE2 у несудинних елементах сітківки не виявлено.

Встановлено, що рівень експресії генів PAC (ACE і рецептора ангіотензину II 1 типу) підвищений, а гена ACE2 – знижений у пацієнтів із ЦД 2 типу. Дослідники пов'язують це з розвитком мікросудинних діабетичних ускладнень [14]. Такі дані певною мірою суперечать тим, що одержали ми та інші дослідники в експерименті, а отже це питання потребує продовження вивчення.

Посилення локальної активності захисної осі PAC ACE2 / ангіотензин (1-7) за допомогою доставки генів ACE2, що опосередкована аденоасоційованим вірусом (AAV), сприяло захисту від виникнення ДР [8,15]. Внутрішньоочне введення AAV-ACE2 / ангіотензин (1-7) спричинило істотне зменшення витоку

судин сітківки, ацелюлярних капілярів, інфільтрації запальних клітин та окиснювального пошкодження у мишей і щурів із діабетом [8]. З іншого боку, втрата ACE2 посилювала ознаки ДР, зокрема показники електроретинографії, збільшувала зони нервових інфарктів і кількість ацелюлярних капілярів, що могло бути скоригованим впливом ангіотензину (1-7) [16]. Отже, штучне підвищення активності осі ACE2 / ангіотензин (1-7) сприяє відновленню балансу PAC і забезпечує захист від ДР.

Зважаючи на це, виявлений значний і тривалий (протягом 3 місяців) приріст вмісту ACE2 у сітківці після моделювання ДР можна визначити як загальну активацію локальної PAC, що має компенсаторний характер. Введення інсуліну супроводжувалося зменшенням гіперглікемії, і тому можна пояснити й зниження ретинального вмісту ACE2. Зауважимо, що ця реакція була максимально вираженою на 21 добу, й надалі ефект від інсуліну зменшувався. Можливо, відбувалося накопичення метаболічних пошкоджень сітківки, й активація PAC опосередковувалася іншими механізмами, а не гіперглікемією.

Одним із таких механізмів може бути активація клітинних протеїназ. Відомо, що ангіотензин II через рецептори 1 типу активує MAP-кінази (ERK 1/2, JNK, p38MAPK), рецепторні тирозинкінази (PDGF, EGFR, рецептор інсуліну) та нерцепторні тирозинкінази (Src, JAK/STAT, кіназа фокальної адгезії) [2]. Блокада клітинних протеїназ мультикіназним інгібітором сорафенібом в умовах ДР може через пригнічення патогенної осі PAC (ACE / ангіотензин II) спричинити активацію осі ACE2 / ангіотензин (1-7). Цим можна пояснити збільшення вмісту ACE2 у сітківці під впливом сорафенібу на 21 добу та через 2 місяці, а через 3 місяці застосування сорафенібу знижувало вміст ACE2. Зазначимо, що у цьому терміні у групі, де щурам вводили інсулін і сорафеніб, ознаки ДР не зафіксовано (на відміну від нелікованого контролю), сітківка в них мала мінімальні зміни, а отже очікуваною була відсутність реакції PAC. Це могло пояснювати зворотний ефект сорафенібу.

Цікаво, що лікування активатором ACE2 ксантоном 9 запобігало загибелі гангліонарних клітин через зниження експресії каспази-3 і апоптозу [17]. Ці дані можуть додатково пояснювати позитивний ефект активації осі ACE2 / ангіотензин (1-7) при ДР.

Виявлення накопичення ACE2 у сітківці при ДР мало особливе значення під час вивчення питання про можливість інфікування коронавірусом (SARS-CoV-2). Відомо, що він ушкоджує майже всі системи та органи, є сильним коморбідним фактором, що погіршує перебіг хронічних захворювань, зокрема ЦД [13]. Результати досліджень, здійснені в умовах пандемії коронавірусної хвороби (COVID-19), показали: пацієнти з ЦД мають більш несприятливі клінічні результати та більший ризик розвитку очних ускладнень [18]. Оскільки не викликає сумнівів роль ACE2 як вхідних воріт для SARS-CoV-2, встановлення факту збільшення його експресії у тканині сітківки при ДР може пояснювати несприятливі клінічні наслідки та високий ризик погіршення перебігу ДР при COVID-19.

Висновки

1. При експериментальній ДР виявлено збільшення експресії ACE2 у стінках судин, що підтвердило залучення цього важливого регулятора РАС у патогенез діабетичного пошкодження сітківки. Виявлено багаторазове збільшення вмісту ACE2: спочатку накопичення його вільних ізоформ, потім – зв'язування з клітинними білками.

2. Ізольоване введення інсуліну знижувало вміст ACE2 через 21 добу і 2 місяці лікування істотніше, ніж комбіноване введення з сорафенібом або окреме введення сорафенібу. Через 3 місяці вміст ACE2, зокрема його високомолекулярних форм, ефективніше знижувало комбіноване введення інсуліну з сорафенібом, ніж окреме введення інсуліну.

3. Результати дослідження дали змогу визначити можливу роль збільшення експресії ACE2 у патогенезі ДР, показали її зниження під час лікування інсуліном і сорафенібом; це відповідало гальмуванню розвитку морфологічних ознак ДР.

Перспективи подальших досліджень. У попередніх дослідженнях показано гальмівний вплив сорафенібу на розвиток експериментальної діабетичної ретинопатії, а в цьому – можливу роль ACE2. Відповідно, надалі обґрунтованим є вивчення механізмів цього ефекту та впливу блокаторів ренін-ангіотензин-альдостеронової системи на розвиток діабетичної ретинопатії.

Фінансування

Дослідження здійснено в рамках НДР Національного медичного університету імені О. О. Богомольця МОЗ України: «Розробка нових методів діагностики, лікування та профілактики рефракційних, запальних, дистрофічних і травматичних захворювань органів зору та їх клініко-експериментальне обґрунтування», державний реєстраційний № 0120U105324 (2020–2025).

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 28.04.2025

Після доопрацювання / Revised: 27.06.2025

Схвалено до друку / Accepted: 09.07.2025

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

Тихомиров А. О., д-р біол. наук, зав. відділу хімії і біохімії ферментів, Інститут біохімії ім. О. В. Паладіна Національної академії наук, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0003-2063-4636

Зяблицев 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.

Tykhomyrov A. O., PhD, DSc, Head of the Department of Chemistry and Biochemistry of Enzymes, Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine.

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



Катерина Усенко (Kateryna Usenko)
usenko1205@gmail.com

References

1. Teo ZL, Tham YC, Yu M, Chee ML, Rim TH, Cheung N, et al. Global Prevalence of Diabetic Retinopathy and Projection of Burden through 2045: Systematic Review and Meta-analysis. *Ophthalmology*. 2021;128(11):1580-91. doi: [10.1016/j.ophtha.2021.04.027](https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2021.04.027)
2. Phipps JA, Dixon MA, Jobling AI, Wang AY, Greferath U, Vessey KA, et al. The renin-angiotensin system and the retinal neurovascular unit: A role in vascular regulation and disease. *Exp Eye Res*. 2019;187:107753. doi: [10.1016/j.exer.2019.107753](https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107753)
3. Li X, Fu YH, Tong XW, Zhang YT, Shan YY, Xu YX, et al. RAAS in diabetic retinopathy: mechanisms and therapies. *Arch Endocrinol Metab*. 2024;68:e230292. doi: [10.20945/2359-4292-2023-0292](https://doi.org/10.20945/2359-4292-2023-0292)
4. Dierschke SK, Dennis MD. Retinal Protein O-GlcNAcylation and the Ocular Renin-angiotensin System: Signaling Cross-roads in Diabetic Retinopathy. *Curr Diabetes Rev*. 2022;18(2):e011121190177. doi: [10.2174/1573399817999210111205933](https://doi.org/10.2174/1573399817999210111205933)
5. Thangaraju P, Chakrabarti A, Banerjee D, Hota D, Tamilselvan, Bhatia A, Gupta A. Dual blockade of Renin Angiotensin system in reducing the early changes of diabetic retinopathy and nephropathy in a diabetic rat model. *N Am J Med Sci*. 2014;6(12):625-32. doi: [10.4103/1947-2714.147978](https://doi.org/10.4103/1947-2714.147978)
6. Chaturvedi N, Porta M, Klein R, Orchard T, Fuller J, Parving HH, et al. Effect of candesartan on prevention (DIRECT-Prevent 1) and progression (DIRECT-Protect 1) of retinopathy in type 1 diabetes: randomised, placebo-controlled trials. *Lancet*. 2008;372(9647):1394-402. doi: [10.1016/S0140-6736\(08\)61412-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61412-9)
7. Sjölle AK, Klein R, Porta M, Orchard T, Fuller J, Parving HH, et al. Effect of candesartan on progression and regression of retinopathy in type 2 diabetes (DIRECT-Protect 2): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2008;372(9647):1385-93. doi: [10.1016/S0140-6736\(08\)61411-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61411-7)
8. Prasad R, Floyd JL, Dupont M, Harbour A, Adu-Agyeiwaah Y, Asare-Bediako B, et al. Maintenance of Enteral ACE2 Prevents Diabetic Retinopathy in Type 1 Diabetes. *Circ Res*. 2023;132(1):e1-e21. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.122.322003](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.122.322003)
9. Ziablitshev SV, Usenko KO, Dobrovinska OV, Perepelytsa YV, Andrushchenko VA. [The metabolic effect of cellular protein kinases blockade on the experimental diabetes]. *Fiziolohichnyi zhurnal*. 2024;70(3):16-26. Ukrainian. doi: [10.15407/fz70.03.016](https://doi.org/10.15407/fz70.03.016)
10. Usenko KO, Rykov SO, Dyadyk OO, Zyablitshev SV. [Effect of cellular protein kinases blockade on the S100 retina expression in experimental diabetic retinopathy]. *Pathologia*. 2024;21(3):226-31. Ukrainian. doi: [10.14739/2310-1237.2024.3.316604](https://doi.org/10.14739/2310-1237.2024.3.316604)
11. Stocker N, Radzikowska U, Wawrzyniak P, Tan G, Huang M, Ding M, et al. Regulation of angiotensin-converting enzyme 2 isoforms by type 2 inflammation and viral infection in human airway epithelium. *Mucosal Immunol*. 2023;16(1):5-16. doi: [10.1016/j.mucimm.2022.12.001](https://doi.org/10.1016/j.mucimm.2022.12.001)
12. Tikellis C, Johnston CI, Forbes JM, Burns WC, Thomas MC, Lew RA, et al. Identification of angiotensin converting enzyme 2 in the rodent retina. *Curr Eye Res*. 2004;29(6):419-27. doi: [10.1080/02713680490517944](https://doi.org/10.1080/02713680490517944)
13. Zhou L, Xu Z, Guerra J, Rosenberg AZ, Fenaroli P, Eberhart CG, et al. Expression of the SARS-CoV-2 Receptor ACE2 in Human Retina and Diabetes-Implications for Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2021;62(7):6. doi: [10.1167/iov.62.7.6](https://doi.org/10.1167/iov.62.7.6)

14. Jena L, Kaur P, Singh T, Sharma K, Kotru S, Munshi A. Gene Expression Analysis in T2DM and Its Associated Microvascular Diabetic Complications: Focus on Risk Factor and RAAS Pathway. *Mol Neurobiol.* 2024;61(11):8656-67. doi: [10.1007/s12035-024-04127-2](https://doi.org/10.1007/s12035-024-04127-2)
15. Dominguez JM 2nd, Hu P, Caballero S, Moldovan L, Verma A, Oudit GY, et al. Adeno-Associated Virus Overexpression of Angiotensin-Converting Enzyme-2 Reverses Diabetic Retinopathy in Type 1 Diabetes in Mice. *Am J Pathol.* 2016;186(6):1688-700. doi: [10.1016/j.ajpath.2016.01.023](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.01.023)
16. Duan Y, Beli E, Li Calzi S, Quigley JL, Miller RC, Moldovan L, et al. Loss of Angiotensin-Converting Enzyme 2 Exacerbates Diabetic Retinopathy by Promoting Bone Marrow Dysfunction. *Stem Cells.* 2018;36(9):1430-40. doi: [10.1002/stem.2848](https://doi.org/10.1002/stem.2848)
17. Foureaux G, Nogueira BS, Coutinho DC, Raizada MK, Nogueira JC, Ferreira AJ. Activation of endogenous angiotensin converting enzyme 2 prevents early injuries induced by hyperglycemia in rat retina. *Braz J Med Biol Res.* 2015;48(12):1109-14. doi: [10.1590/1414-431X20154583](https://doi.org/10.1590/1414-431X20154583)
18. Boden I, Bernabeu MO, Dhillon B, Dorward DA, McCormick I, Megaw R, et al. Pre-existing diabetic retinopathy as a prognostic factor for COVID-19 outcomes amongst people with diabetes: A systematic review. *Diabetes Res Clin Pract.* 2022;187:109869. doi: [10.1016/j.diabres.2022.109869](https://doi.org/10.1016/j.diabres.2022.109869)