

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Жупан Дана Богданівна**

*УДК 616.379-008.64-085-06:617.731]-092*

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦІЇ ТА  
ОБҐРУНТУВАННЯ ЇЇ КОРЕКЦІЇ ПРИ ДІАБЕТИЧНОМУ  
УРАЖЕННІ СІТКІВКИ**

22 – Охорона здоров'я

222 – Медицина

Подається на здобуття ступеню доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ Д.Б. Жупан  
*(підпис, ініціали та прізвище здобувача)*

Науковий керівник Зяблицев Сергій Володимирович, доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри патофізіології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця

Київ – 2024

## АНОТАЦІЯ

*Жупан Д.Б.* Механізми розвитку нейродегенерації та обґрунтування її корекції при діабетичному ураженні сітківки. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 – «Медицина», 22 – «Охорона здоров'я». – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України, Київ, 2024.

Дисертація присвячена вирішенню актуального завдання сучасної патофізіології – вивченню механізмів розвитку нейродегенерації сітківки при її діабетичному ураженні та обґрунтуванню нового шляху патогенетичної корекції: застосуванню агоністу ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетаму.

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Серед неінфекційних захворювань цукровий діабет (ЦД) вийшов на перші позиції за медико-соціальною значущістю та останнім часом розглядається як пандемія XXI сторіччя (Ogurtsova K. et al., 2017; Saeedi P. et al., 2019). Його поширеність у 2019 році складала понад 360 млн. осіб, що до 2030 року збільшиться вдвічі (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group, 2020; Sanz-González SM et al, 2020). Найчастішою з причин інвалідизації у пацієнтів з ЦД є офтальмологічні ускладнення, зокрема – діабетична ретинопатія (ДР) (Sun H et al., 2022; Wong TY et al., 2020).

Уявлення про патогенез ДР по мірі накопичення наукових знань змінювалися. Метаболічна та запальна теорії, згідно яким ушкодження ока при ЦД розглядалося як наслідок хронічного запалення, доповнилася визнанням ролі судинної патології і, насамперед, це – порушення мікроциркуляції сітківки (Кирилюк МЛ зі співавт, 2019; Wang W et al., 2018). Оцінюючи патологічні зміни сітківки при ДР, слід визнати першочергове значення процесів нейродегенерації (Sundstrom JM et al.,

2018). Метаболічні, запальні та судинні зміни сітківки при ДР мають значення з точки зору саме пошкодження нейронів, їх відростків та гліальних клітин. Незалежно від інших проявів у сітківці розвиваються ознаки нейродегенеративного процесу – дегенерація та апоптоз нейронів, астроцитів та клітин Мюллера, активація нейроглії з проявами нейронофагії (Simó R, et al., 2018, 2019).

Гамааміномасляна кислота (ГАМК) є основним гальмівним медіатором у ЦНС ссавців. У сітківці вона бере участь у передачі сигналу з горизонтальних клітин на фоторецептори. Посилення гальмівного впливу ГАМК призводить до функціональної блокади та розвантаження амакринових та гангліозних клітин (Eggers ED et al., 2020, 2023). Ці міркування можуть бути обґрунтуванням для використання ГАМК-ергічних препаратів при ДР. Серед останніх значної уваги заслуговує модулятор ГАМК-бензодіазепінового рецепторного комплексу, похідне  $\beta$ -карболіну – карбацетам, розроблений в Інституті фізико-органічної хімії та вуглехімії НАН України. Встановлено, що карбацетам проявляє виражену антигіпоксичну, анксиолітичну і протишокову дії, завдяки чому може стати перспективним засобом попередження нейрогенної дисфункції різного генезу (Kmet OG et al., 2019; Ziablitsev SV et al., 2017). Відомі властивості карбацетаму дозволяють припустити можливість його використання для патогенетично обґрунтованої корекції нейрохімічного дисбалансу за умов діабетичного пошкодження сітківки.

**Мета дослідження** – вивчити механізми розвитку нейродегенерації сітківки при її діабетичному ураженні та обґрунтувати новий напрямок патогенетичної корекції шляхом застосування агоністу ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетаму.

**Завдання дослідження:**

1. Виявити морфологічні ознаки нейродегенерації сітківки за умов її діабетичного пошкодження та впливу на неї введення інсуліну і комбінації

інсуліну з агоністом ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетамом.

2. Визначити експресію специфічного нейронального маркера – нейронспецифічної енолази (NSE) та вплив на неї введення інсуліну і комбінації інсуліну з агоністом ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетамом.

3. Визначити експресію маркера нервових волокон – нейрофіламентів (NF-H) та вплив на неї введення інсуліну і комбінації інсуліну з агоністом ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетамом.

4. Вивчити стан макроглії та апоптозу сітківки за експресією гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) і каспази-3 та вплив на них введення інсуліну і комбінації інсуліну з агоністом ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетамом.

5. Вивчити стан мікроглії сітківки за експресією білка S-100 та вплив на неї введення інсуліну і комбінації інсуліну з агоністом ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетамом.

6. Визначити експресію маркера патологічного ангиогенезу – васкулоендотеліального фактору росту судин (VEGF) та маркера гіпоксії – гіпоксіяіндуцибельного фактору-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) та вплив на них введення інсуліну і комбінації інсуліну з агоністом ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетамом.

*Об'єкт дослідження:* нейродегенерація сітківки, що розвивається за умов її діабетичного ураження.

*Предмет дослідження:* морфологічні прояви нейродегенерації сітківки при розвитку експериментальної діабетичної ретинопатії; експресія маркерів нейродегенерації (NSE і NF-H), гліальної реакції (GFAP і S-100), апоптозу (каспаза-3), патологічного ангиогенезу (VEGF) і гіпоксії (HIF-1 $\alpha$ ) у сітківці; вплив застосування агоністу ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетаму на розвиток процесів нейродегенерації, експресію та вміст протеїнів у сітківці, прояви діабетичного ураження сітківки.

*Методи дослідження:* експериментальні (моделювання діабетичного ураження сітківки), біохімічні (вимірювання глюкози у крові), морфологічні (вивчення зрізів сітківки), імуногістохімічні (визначення експресії протеїнових маркерів у сітківці), імуноблотингові (визначення вмісту протеїнів у сітківці), статистичні.

У роботі уточнено наукові дані щодо раннього розвитку нейродегенерації при діабетичному ураженні сітківки. Виявлено зниження щільності нервових клітин та розрихлення нервових волокон з подальшим наростанням розрідження клітин у ядерних шарах, гіпохромії нейронів з вакуолізацією цитоплазми, екстрацелюлярного набряку, зниженням щільності нервових волокон у плексиформних шарах. Гангліонарні клітини мали виражену вакуолізацію, а подекуди гіперхромію цитоплазми, пікноз ядер. Ці зміни прогресували на тлі інших проявів ДР, таких як набряк з ділянками ішемії, повнокрів'я і дилатація судин, утворення мікроаневризм у внутрішніх шарах (з 14-ї доби) та клітинних проліфератів у зовнішніх шарах сітківки (з 28-ї доби). Лікування інсуліном покращувало стан сітківки, а додавання до його введення карбацетаму попереджало розвиток нейродегенеративних та інших проявів ДР.

Виражене NSE-позитивне забарвлення мали гангліонарні клітини, нейрони внутрішнього та зовнішнього ядерних шарів та внутрішній сегмент фоторецепторів. З 14-ї доби інтенсивність забарвлення суттєво знижувалася, а у внутрішньому ядерному шарі з'являлося фонове забарвлення, яке свідчило про руйнування нейронів. Застосування інсуліну і, більшою мірою, інсуліну з карбацетамом сприяло зберіганню NSE-позитивних нервових клітин та зменшенню фонового забарвлення.

NF-H-позитивне забарвлення відмічене у поздовжніх нервових волокнах, які за морфологією відповідали аксонам горизонтальних та амакринових клітин; а також у волокнах та аксональних пагорбах гангліонарних нейронів. При розвитку ДР спостерігалось прогресуюче

зниження інтенсивності NF-H-позитивного забарвлення. У шарі нервових волокон забарвлені елементи концентрувалися навколо розширених мікросудин, які мали тенденцію до утворення мікроаневризм. На 28-му добу у внутрішньому плексиформному шарі було відмічено зникнення NF-H-позитивного забарвлення. Введення інсуліну сприяло менш вираженому зниженню інтенсивності NF-H-позитивного забарвлення, а введення карбацетаму запобігало його втраті у шарах сітківки, імуноспецифічні волокна зовнішнього плексиформного шару зберігали високу інтенсивність забарвлення, більш чітку структуру нервових сплетінь, які продовжувалися у внутрішній ядерний шар. Простежувалися аксони та аксональні пагорби у гангліонарних клітинах шару нервових волокон.

Експресія GFAP характеризувалася поступовою активацією із першочерговим залученням астроцитів внутрішніх шарів сітківки, потім – клітин Мюллера (реактивний гліоз). GFAP-позитивні клітини тісно контактували з вогнищами патологічного ангиогенезу внутрішніх шарів сітківки, а також брали участь в утворенні клітинних проліфератів у зовнішніх шарах. Вміст GFAP у тканинах сітківки за результатами імуноблотингу суттєво зростає. Карбацетам знижував експресію та вміст GFAP і каспази-3 у сітківці та попереджував розвиток реактивного гліозу, ангиогенезу та утворення клітинних проліфератів.

Встановлено, що S100-позитивне забарвлення мали тіла численних поліморфних клітин внутрішнього ядерного шару та гліальні волокна, що муфтоподібно охоплювали тіла гангліонарних нейронів. При розвитку ДР інтенсивність забарвлення клітин Мюллера значно зростала, чітко візуалізувалися їх довгі радіальні відростки. Інтенсивне забарвлення відмічено у зовнішньому ядерному шарі та на його межі з шаром паличок і колбочок, а також – у шарі гангліонарних клітин. На 28-у добу S100-позитивні нервові волокна щільно контактували з мікроаневризмами. Застосування інсуліну призводило до послаблення інтенсивності S100-

позитивного забарвлення, а комбіноване введення інсуліну і карбацетаму гальмувало експресію білка S100 і запобігало утворенню мікроаневризм.

При розвитку ДР у тканинах сітківки суттєво зростає вміст VEGF. Його експресія була активована як у внутрішніх, так і у зовнішніх шарах, особливо – у місцях утворення мікроаневризм та клітинних проліфератів. При введенні інсуліну вміст VEGF був нижчим, ніж у контролі, а введення інсуліну з карбацетамом блокувало приріст вмісту VEGF у сітківці. Вміст HIF-1 $\alpha$  у сітківці піднімався лише на 28-у добу, що значно зменшувалося при введенні інсуліну і карбацетаму.

Таким чином, вперше відкритий ефект карбацетаму зі зниженням експресії GFAP, каспази-3, VEGF та HIF-1 $\alpha$  при збільшенні експресії NSE і нейрофіламентів висвітлює важливу роль ГАМК-ергічного дисбалансу сітківки, а, з іншого боку, обґрунтував можливість використання препарату для запобігання нейродегенерації та збереження нейронів сітківки, гальмування надмірної активації глії, апоптозу, патологічного ангиогенезу та клітинної проліферації при діабетичному ураженні сітківки.

#### **Практична значимість отриманих результатів.**

Запобігання розвитку нейродегенерації у сітківці при введенні агоністу ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетаму є підставою для подальшої розробки цього напрямку патогенетичної корекції.

**Публікації.** Основні результати роботи оприлюднені в 10 наукових публікаціях. З них 5 робіт – статті в журналах відповідно до «Переліку наукових фахових видань України, в яких можуть публікуватися результати дисертаційних робіт на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук», у тому числі – 3 у виданнях, віднесених до бази даних Scopus; 5 робіт – тези у матеріалах науково-практичних конференцій.

**Ключові слова:** *цукровий діабет, діабетична ретинопатія, нейродегенерація, карбацетам, стрептозотцин, NSE, NF-H, GFAP, S100 protein, VEGF, каспаза-3, HIF-1 $\alpha$ .*

### **Список публікацій здобувача за темою дисертації.**

*Наукові праці, в яких опубліковані основні результати дисертації:*

1. Зяблицев СВ, Жупан ДБ, Дядик ОО. Вплив бензодіазепінових рецепторів на стан глії при розвитку діабетичної ретинопатії. Фізіологічний журнал. 2023; 69(6):33-42. <https://doi.org/10.15407/fz69.06.033>.

2. Ziablitsev SV, Zhupan DB, Tykhomyrov AO, Dyadyk OO. Benzodiazepine receptor agonist Carbacetam modulates the level of vascular endothelial growth factor in the retina of rats with streptozotocin-induced diabetes. Ukr Biochem J. 2023.;6(95):21-29. <https://doi.org/10.15407/ubj95.06.021>.

3. Ziablitsev SV, Zhupan DB. The state of S100-positive glia and the effect on it on the GABA-benzodiazepine receptor agonist, carbacetam, in diabetic retinopathy. Journal of Ophthalmology (Ukraine). 2024;3(518):33-39. <https://doi.org/10.31288/oftalmolzh202433339>.

4. Зяблицев СВ, Жупан ДБ. Експресія нейрон-специфічної енолази в сітківці та вплив на неї агоніста бензодіазепінових рецепторів карбацетаму при експериментальній діабетичній ретинопатії. Архів офтальмології України. 2024;12(1):9-15. <https://doi.org/10.22141/2309-8147.12.1.2024.350>.

5. Жупан ДБ. Експресія нейрофіламентів у сітківці при експериментальній діабетичній ретинопатії та вплив агоністу бензодіазепінових рецепторів карбацетаму. Медична наука України. 2024;20(1):80-88. <https://doi.org/10.32345/2664-4738.1.2024.11>.

*Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:*

6. Зяблицев СВ, Жупан ДБ. Експресія гліального фібрилярного протеїну (GFAP) у сітківки при експериментальному стрептозотоциновому діабеті. В кн.: Бюллетень мат-лів наук. конф. XXII читання ім. В.В. Підвисоцького (18-19 травня 2023 р.). Одеса: УкрНДІ медицини транспорту, 2023:81-82.



7. Жупан ДБ. Ретинальна експресія васкулоендотеліального фактора росту у тканинах сітківки при експериментальній діабетичній ретинопатії та вплив агоніста бензодіазепінових рецепторів карбацетаму. Мат-ли VI науково-практичної internet-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція», м. Харків, 16 листопада 2023 р., 2023:201.

8. Жупан ДБ, Зябліцев СВ. Ефект агоністу бензодіазепінових рецепторів карбацетаму на експресію нейрофіламентів у сітківці при експериментальному цукровому діабеті. Зб. наук. праць за матеріалами ХХ Всеукраїнської наукової конференції «Актуальні питання біології та медицини», м. Лубни, 24 травня 2024 р. Лубни. Вид-во ДЗ «ЛНУ імені Тараса Шевченка». 2024:79-81.

9. Жупан ДБ, Зябліцев СВ, Заріцька ОО., Бабенко МС. Гліальні реакції при розвитку ранньої діабетичної ретинопатії та вплив агоністу ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетаму. В кн.: Бюлетень мат-лів наук. конф. ХХІІІ читання В.В. Підвисоцького (16-17 травня 2024 р.). Одеса: УкрНДІ медицини транспорту. 2024:52-54.

10. Зябліцев СВ, Жупан ДБ, Бабенко МС. Реакція глії при розвитку діабетичної ретинопатії та вплив агоністу бензодіазепінових рецепторів карбацетаму. Мат-ли ІХ Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю «Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України», присвяченого 100-річчю Української патологічної фізіології. 19-21 вересня 2024 р., Івано-Франківськ, 2024. Одеса: Сімекс Прінт. 2024:99-100.

## ANNOTATION

*Zhupan D.B.* Mechanisms of neurodegeneration development and rationale for its correction in diabetic retinal damage. – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for obtaining the degree of Doctor of Philosophy in specialty 222 – "Medicine", 22 – "Health Care". – National Medical University named after O.O. Bogomolets, Ministry of Health of Ukraine, Kyiv, 2024.

The dissertation is dedicated to the solution of the current task of modern pathophysiology - the study of the mechanisms of the development of retina neurodegeneration with its diabetic lesion and the justification of a new path of pathogenetic correction: the use of the GABA-benzodiazepine receptor agonist carbacetam.

**Justification of the choice of research topic.** Among non-infectious diseases, diabetes mellitus (DM) has taken the first positions in terms of medical and social significance and has recently been considered as a pandemic of the 21st century (Ogurtsova K. et al., 2017; Saeedi P. et al., 2019). Its prevalence is more than 360 million, which will double by 2030 (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group, 2020; Sanz-González SM et al, 2020). The most frequent cause of disability in patients with DM is ophthalmological complications, in particular, diabetic retinopathy (Sun H et al., 2022; Wong TY et al., 2020).

Ideas about the pathogenesis of DR changed as scientific knowledge accumulated. Metabolic and inflammatory theories, according to which eye damage in DM was considered as a consequence of chronic inflammation, were supplemented by recognition of the role of vascular pathology and, first of all, retinal microcirculation disorders (Kiriluk ML et al., 2019; Wang W et al., 2018). When evaluating pathological changes of the retina in DR, the primary importance of neurodegeneration processes should be recognized (Sundstrom JM et al., 2018). Metabolic, inflammatory and vascular changes of the retina in DR are important from the point of view of damage to neurons, their processes and glial cells.

Regardless of other manifestations, signs of a neurodegenerative process develop in the retina - degeneration and apoptosis of neurons, astrocytes, and Müller cells, activation of neuroglia with manifestations of neuronophagy (Simó R, et al., 2018, 2019).

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is the main inhibitory mediator in the mammalian CNS. In the retina, it is involved in signal transmission from horizontal cells to photoreceptors. Increasing the inhibitory effect of GABA leads to functional blockade and unloading of amacrine and ganglion cells (Eggers ED et al., 2020, 2023). These considerations may be the rationale for the use of GABA-ergic drugs in DR. Among the latter, the modulator of the GABA-benzodiazepine receptor complex, a  $\beta$ -carboline derivative - carbacetam, developed at the Institute of Physical-Organic Chemistry and Coal Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, deserves significant attention. It has been established that carbacetam exhibits pronounced antihypoxic, anxiolytic and antishock effects, due to which it can become a promising means of preventing neurogenic dysfunction of various genesis (Kmet OG et al., 2019; Ziablitsev SV et al., 2017). The known properties of carbacetam allow us to assume the possibility of its use for pathogenetically justified correction of neurochemical imbalance under conditions of diabetic retinal damage.

**The purpose of the research** is to study the mechanisms of the development of retinal neurodegeneration in its diabetic lesion and to justify a new direction of pathogenetic correction by using the GABA-benzodiazepine receptor agonist carbacetam.

**Objectives of the study:**

1. To identify the morphological signs of retinal neurodegeneration under the conditions of its diabetic damage and the effect on it of the administration of insulin and the combination of insulin with the agonist of GABA-benzodiazepine receptors carbacetam.

2. To determine the expression of a specific neuronal marker - neuron-

specific enolase (NSE) and the effect on it of the introduction of insulin and the combination of insulin with the agonist of GABA-benzodiazepine receptors carbacetam.

3. To determine the expression of the marker of nerve fibers - neurofilaments (NF-H) and the effect on it of the introduction of insulin and the combination of insulin with the agonist of GABA-benzodiazepine receptors carbacetam.

4. To study the state of macroglia and apoptosis of the retina based on the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and caspase-3 and the effect on them of insulin administration and the combination of insulin with the GABA-benzodiazepine receptor agonist carbacetam.

5. To study the state of retinal microglia based on S-100 protein expression and the effect on them of insulin administration and the combination of insulin with the GABA-benzodiazepine receptor agonist carbacetam.

6. To determine the expression of the marker of pathological angiogenesis - vascular endothelial growth factor (VEGF) and the marker of hypoxia - hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and the effect on them of the introduction of insulin and the combination of insulin with the agonist of GABA-benzodiazepine receptors carbacetam.

*The object of research:* neurodegeneration of the retina, which develops under the conditions of its diabetic damage.

*Subject of research:* morphological manifestations of retinal neurodegeneration in the development of experimental diabetic retinopathy; expression of markers of neurodegeneration (NSE and NF-H), glial reaction (GFAP and S-100), apoptosis (caspase-3), pathological angiogenesis (VEGF) and hypoxia (HIF-1 $\alpha$ ) in the retina; the effect of the use of the GABA-benzodiazepine receptor agonist carbacetam on the development of neurodegeneration processes, the expression and content of proteins in the retina, manifestations of diabetic retinal damage.

*Research methods:* experimental (modeling of diabetic retinal damage), biochemical (measurement of glucose in the blood), morphological (study of retinal sections), immunohistochemical (determination of the expression of protein markers in the retina), immunoblotting (determination of protein content in the retina), statistical.

Scientific data on the early development of neurodegeneration in diabetic retinal damage are specified in the work. A decrease in the density of nerve cells and loosening of nerve fibers with a subsequent increase in the thinning of cells in the nuclear layers, hypochromia of neurons with vacuolization of the cytoplasm, extracellular edema, and a decrease in the density of nerve fibers in the plexiform layers were revealed. Ganglion cells had pronounced vacuolization, and in some places hyperchromia of the cytoplasm, pyknosis of the nuclei. These changes progressed against the background of other manifestations of DR, such as edema with areas of ischemia, hemoptysis and dilatation of blood vessels, the formation of microaneurysms in the inner layers (from the 14th day) and cellular proliferations in the outer layers of the retina (from the 28th day). Treatment with insulin improved the condition of the retina, and the addition of carbacetam to its administration prevented the development of neurodegenerative and other manifestations of DR.

Pronounced NSE-positive staining had ganglion cells, neurons of the inner and outer nuclear layers, and the inner segment of photoreceptors. From the 14th day, the intensity of staining significantly decreased, and background staining appeared in the inner nuclear layer, which indicated the destruction of neurons. The use of insulin and, to a greater extent, insulin with carbacetam contributed to the preservation of NSE-positive nerve cells and the reduction of background staining.

NF-H-positive staining was noted in longitudinal nerve fibers, which morphologically corresponded to axons of horizontal and amacrine cells; as well as in fibers and axonal hills of ganglion neurons. With the development of DR, a progressive decrease in the intensity of NF-H-positive staining was observed. In the layer of nerve fibers, stained elements were concentrated around dilated

microvessels, which tended to form microaneurysms. On the 28th day, the disappearance of NF-H-positive staining was noted in the inner plexiform layer. Administration of insulin contributed to a less pronounced decrease in the intensity of NF-H-positive staining, while administration of carbacetam prevented its loss in the layers of the retina, immunospecific fibers of the outer plexiform layer maintained a high intensity of staining, a clearer structure of nerve plexuses that continued into the inner nuclear layer. Axons and axonal hills were traced in the ganglion cells of the layer of nerve fibers.

GFAP expression was characterized by gradual activation with the primary involvement of astrocytes of the inner layers of the retina, then Müller cells (reactive gliosis). GFAP-positive cells were in close contact with foci of pathological angiogenesis in the inner layers of the retina, and also participated in the formation of cellular proliferates in the outer layers. The content of GFAP in retinal tissues increased significantly according to the results of immunoblotting. Carbacetam reduced the expression and content of GFAP and caspase-3 in the retina and prevented the development of reactive gliosis, angiogenesis, and the formation of cell proliferates.

It was established that the bodies of numerous polymorphic cells of the inner nuclear layer and glial fibers, which covered the bodies of ganglion neurons in a sleeve-like manner, had S100-positive staining. During the development of DR, the intensity of staining of Müller cells increased significantly, and their long radial processes were clearly visualized. Intense staining was noted in the outer nuclear layer and on its border with the layer of rods and cones, as well as in the layer of ganglion cells. On the 28th day, S100-positive nerve fibers were in close contact with the microaneurysm. The use of insulin led to a weakening of the intensity of S100-positive staining, and the combined administration of insulin and carbacetam inhibited the expression of the S100 protein and prevented the formation of microaneurysms.

During the development of DR, the content of VEGF in retinal tissues

increased significantly. Its expression was activated both in the inner and outer layers, especially in the sites of microaneurysm formation and cellular proliferations. With the introduction of insulin, the content of VEGF was lower than in the control, and the introduction of insulin with carbacetam blocked the increase in the content of VEGF in the retina. The content of HIF-1 $\alpha$  in the retina rose only on the 28th day, which significantly decreased with the introduction of insulin and carbacetam.

Thus, the first discovered effect of carbacetam with a decrease in the expression of GFAP, caspase-3, VEGF and HIF-1 $\alpha$  while increasing the expression of NSE and neurofilaments highlighted the important role of retinal GABA-ergic imbalance and, on the other hand, substantiated the possibility of using the drug to prevent neurodegeneration and will keep regeneration of retinal neurons, inhibition of excessive glial activation, apoptosis, pathological angiogenesis and cell proliferation in diabetic retinal damage.

**Practical significance of the obtained results.**

Prevention of the development of neurodegeneration in the retina with the introduction of the GABA-benzodiazepine receptor agonist carbacetam is the basis for further development of this direction of pathogenetic correction.

**Publications.** The main results of the work were published in 10 scientific publications. Of these, 5 works are articles in magazines in accordance with the "List of scientific professional publications of Ukraine, in which the results of dissertation works for obtaining the scientific degrees of doctor and candidate of sciences can be published", including - 3 in publications included in the Scopus database; 5 works - theses in materials of scientific and practical conferences.

**Key words:** *diabetes, diabetic retinopathy, neurodegeneration, carbacetam, streptozotocin, NSE, NF-H, GFAP, S100 protein, VEGF, caspase-3, HIF-1 $\alpha$ .*

**List of publications of the recipient by the topic of the dissertation.**

*Scientific works in which the main results of the dissertation are published:*

1. Zyablitzev SV, Zhupan DB, Dyadyk OO. The influence of benzodiazepine receptors on the state of glia in the development of diabetic retinopathy. *Physiological journal*. 2023; 69(6):33-42. <https://doi.org/10.15407/fz69.06.033>.

2. Ziablitsev SV, Zhupan DB, Tykhomyrov AO, Dyadyk OO. Benzodiazepine receptor agonist Carbacetam modulates the level of vascular endothelial growth factor in the retina of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Ukr Biochem J*. 2023.;6(95):21-29. <https://doi.org/10.15407/ubj95.06.021>.

3. Ziablitsev SV, Zhupan DB. The state of S100-positive glia and the effect on it of the GABA-benzodiazepine receptor agonist, carbacetam, in diabetic retinopathy. *Journal of Ophthalmology (Ukraine)*. 2024;3(518):33-39. <https://doi.org/10.31288/oftalmolzh202433339>.

4. Zyablitzev SV, Zhupan DB. Expression of neuron-specific enolase in the retina and the effect on it of the benzodiazepine receptor agonist carbacetam in experimental diabetic retinopathy. *Archive of Ophthalmology of Ukraine*. 2024;12(1):9-15. <https://doi.org/10.22141/2309-8147.12.1.2024.350>.

5. Zhupan DB. Expression of neurofilaments in the retina in experimental diabetic retinopathy and the effect of the benzodiazepine receptor agonist carbacetam. *Medical science of Ukraine*. 2024;20(1):80-88. <https://doi.org/10.32345/2664-4738.1.2024.11>.

*Scientific works certifying the approval of the dissertation materials:*

6. Zyablitzev SV, Zhupan DB. Expression of glial fibrillary protein (GFAP) in the retina in experimental streptozotocin diabetes. In the book: *Bulletin of Mat. Sci. conf. XXII reading named after V.V. Podvysotskyi (May 18-19, 2023)*. – Odesa: UkrNDI of Transport Medicine. 2023:81-82.

7. Zhupan DB. Retinal expression of vasculoendothelial growth factor in retinal tissues in experimental diabetic retinopathy and the effect of the benzodiazepine receptor agonist carbacetam. *Materials of the VI scientific and*



practical internet conference with international participation "Mechanisms of development of pathological processes and diseases and their pharmacological correction", Kharkiv, November 16, 2023. 2023:201.

8. Zhupan DB, Zyablitzev SV. Effect of the benzodiazepine receptor agonist carbacetam on retinal neurofilament expression in experimental diabetes. Coll. of science papers based on the materials of the 20th All-Ukrainian Scientific Conference "Current Issues in Biology and Medicine", Lubny, May 24, 2024. Lubny: Publishing House "Taras Shevchenko LNU". 2024:79-81.

9. Zhupan DB, Zyablitzev SV, Zaritska OO, Babenko MS. Glial reactions in the development of early diabetic retinopathy and the effect of the agonist gamk-benzodiazepine receptors carbacetam. In the book: Bulletin of Mathematical Sciences. conf. XXIII reading of V.V. Podvysotskyi (May 16-17, 2024). Odesa: UkrNDI of Transport Medicine. 2024:52-54.

10. Zyablitzev SV, Zhupan DB, Babenko MS. The response of glia in the development of diabetic retinopathy and the effect of the benzodiazepine receptor agonist carbacetam. Materials of the IX National Congress of Pathophysiologists of Ukraine with international participation "Pathological physiology – health care of Ukraine", dedicated to the 100th anniversary of Ukrainian pathological physiology. September 19-21, 2024, Ivano-Frankivsk, 2024. Odesa: Simex Print. 2024:99-100.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	20
ВСТУП .....	21
<b>РОЗДІЛ 1 ПРОБЛЕМА ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ ТА ДІАБЕТИЧНОГО УШКОДЖЕННЯ СІТКІВКИ. МЕХАНІЗМИ ТА МОЖЛИВОСТІ ПАТОГЕНЕТИЧНОЇ КОРЕКЦІЇ (огляд літератури).....</b>	<b>31</b>
1.1 Значення проблеми цукрового діабету та діабетичного ураження сітківки (діабетичної ретинопатії).....	31
1.2 Механізми процесів нейродегенерації при діабетичному ураженні сітківки.....	32
1.3 Значення окремих маркерів патологічних процесів при діабетичному ураженні сітківки.....	35
1.4 Напрямки патогенетичної корекції нейродегенерації сітківки.....	41
<b>РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....</b>	<b>44</b>
2.1 Утримання тварин та моделювання діабетичного пошкодження сітківки. Дизайн дослідження.....	44
2.2 Морфологічні та імуногістохімічні дослідження.....	47
2.3 Дослідження методом імуноблотингу.....	52
2.4 Статистичні методи дослідження.....	56
<b>РОЗДІЛ 3 ОТРИМАНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>	<b>57</b>
3.1 Характеристика нейродегенеративних процесів у сітківці при її діабетичному ураженні.....	57
3.2 Експресія нейроноспецифічної енолази (NSE) у сітківці та вплив на неї агоністу бензодіазепінових рецепторів карбацетаму.....	61

3.3	Експресія нейрофіламентів у сітківці та вплив агоністу бензодіазепінових рецепторів карбацетаму.....	66
3.4	Експресія гліального кислого фібрилярного протеїну (GFAP) і каспази-3 у сітківці та вплив агоністу бензодіазепінових рецепторів карбацетаму.....	70
3.5	Експресія білка S100 у сітківці та вплив агоністу бензодіазепінових рецепторів карбацетаму.....	77
3.6	Експресія васкулоендотеліального фактора росту (VEGF) і гіпоксіяіндуцибельного фактору (HIF-1 $\alpha$ ) у сітківці та вплив агоністу бензодіазепінових рецепторів карбацетаму.....	82
	АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ....	90
	ВИСНОВКИ.....	106
	ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	110
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	111
	ДОДАТКИ.....	137
	Додаток № 1. Акти впровадження результатів роботи у науковій та практичній діяльності.....	137
	Додаток № 2. Список публікацій здобувача.....	145

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

ГАМК	– гамааміномасляна кислота;
ДР	– діабетична ретинопатія;
ЦД	– цукровий діабет;
GFAP	– гліальний фібрилярний кислий протеїн;
HIF-1 $\alpha$	– гіпоксіяіндуцибельний фактор-1 $\alpha$ ;
kDa	– кілодальтон;
NF-H	– важкі ланцюги нейрофіламентів;
NSE	– нейроноспецифічна енолаза;
p	– вірогідність відмінностей;
S-100	– нейроспецифічний білок S-100;
VEGF	– васкулоендотеліальний фактор росту судин.

## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Серед неінфекційних захворювань цукровий діабет (ЦД) вийшов на перші позиції за медико-соціальною значущістю та останнім часом розглядається як пандемія ХХІ сторіччя [97, 113]. Його поширеність складає понад 360 млн. осіб, що за прогнозами до 2030 року збільшиться вдвічі [38, 115]. Найчастішою з причин інвалідності у пацієнтів з ЦД є офтальмологічні ускладнення, зокрема – діабетична ретинопатія (ДР) [142, 169].

Уявлення про патогенез ДР по мірі накопичення наукових знань змінювалися. Класична метаболічна теорія доповнилася розумінням ролі окисного стресу, запалення та мікроциркуляторних порушень [9, 165]. При ДР у сітківці розгортається цілий ряд подій, які характерні для хронічного запалення – інфільтрація стінок судин запальними клітинами, збільшення проникності судин та тканинний набряк, активація утворення прозапальних цитокінів, апоптоз та втрата перицитів і ендотелію, патологічна неоваскуляризація [144]. Таке запалення має млявий хронічний перебіг і характеризується як метаболічне (метазапалення).

Ініціальні зсуви метаболізму та запальні реакції, які індукуються хронічною гіперглікемією, призводять до розвитку і прогресування пошкодження судин, яке починається з ендотеліальної дисфункції [119, 122, 157]. За умов хронічної гіперглікемії в ендотелії капілярів сітківки розгортається каскад патологічних реакцій внаслідок глюкозотоксичності, інтенсифікації окисного стресу, надмірної дії стимулюючих гіпертензивних та запальних факторів, активаторів тромбоутворення [67]. У свою чергу ендотеліальна дисфункція включається в патогенез ЦД та викликає розвиток подальших метаболічних і запальних порушень.

Підсумовуючи дослідження останніх років можна вважати, що основними механізмами розвитку ДР є хронічне метазапалення з індукцією

активованими лейкоцитами експресії молекул адгезії, ушкодженням ендотеліоцитів окисними радикалами; синдроми вазорегресії та васкулярної обструкції з «протіканням» капілярів; збільшення продукції факторів росту, особливо, ендотеліального фактору росту; індукція оксидативного стресу; гіперекспресія прозапальних цитокінів; активація поліолового шляху метаболізму глюкози та збільшення продукції сорбітолу з порушенням внутрішньоклітинного осмотичного балансу; активація протеїнкінази С і матриксних металопротеїназ з деградацією міжклітинного матриксу [14, 38, 52].

Оцінюючи патологічні зміни сітківки при ДР, слід визнати першочергове значення процесів нейродегенерації [10, 66, 71]. Запальні та судинні зміни сітківки при ДР мають значення з точки зору саме пошкодження нейронів, їх відростків та гліальних клітин.

У цьому плані необхідно зазначити, що процеси дегенерації нервових клітин сітківки передують запальним та судинним порушенням [21, 80, 85, 87]. Незалежно від інших проявів у сітківці розвиваються ознаки нейродегенеративного процесу – дегенерація та апоптоз нейронів, астроцитів та клітин Мюллера, активація нейроглії з проявами нейронофагії [128, 131].

Серед механізмів пошкодження нервових клітин при ДР необхідно виділити важливий специфічний процес, який обумовлений розвитком глутаматної ексайтотоксичності [39]. Ранні нейрональні зміни при ДР є наслідком порушення зворотного захоплення глутамату клітинами Мюллера та перетворення його у фізіологічний медіатор глютамін. Накопичення останнього зумовлює нейрохімічні кальцієві механізми пошкодження [15, 33, 80, 96].

Відповідно до наведеного, ідеологія патогенетичного лікування ДР має передбачати застосування елементів нейропротекції [88, 99]. Ціллю такого впливу має бути переривання швидких реакцій глутамат-

кальцієвого каскаду і блокада ушкоджувальних вільнорадикальних механізмів, а згодом – зниження продукції прозапальних цитокінів, прооксидантних ферментів і переривання апоптозу нейронів.

Гамааміномасляна кислота (ГАМК) є основним гальмівним медіатором у ЦНС ссавців. У сітківці вона бере участь у передачі сигналу з горизонтальних клітин на фоторецептори. Посилення гальмівного впливу ГАМК може приводити до функціональної блокади та розвантаження амакринових та гангліозних клітин [39]. Ці міркування можуть бути обґрунтуванням для використання при ДР ГАМК-ергічних препаратів. Серед останніх значної уваги заслуговує карбацетам, розроблений в Інституті фізико-органічної хімії та вуглехімії НАН України. Препарат належить до ендogenous модуляторів ГАМК-бензодіазепінового рецепторного комплексу, похідних  $\beta$ -карболіну, та представляє собою карболіновий ізостер (1-оксо-3,3,6-триметил-1,2,3,4-тетрагідроіндоло [2,3-с]хінолін);  $\beta$ -карболінова структура є основою для алкалоїдів ( $\beta$ -карболінів), які виділені з квітки – гармали звичайної (*Peganum harmala*). За антиамнестичною активністю карбацетам в 100 разів, а за антигіпоксичною – у 29-35 разів перевершує пірацетам, що є класичним препаратом з ноотропною дією. Встановлено, що карбацетам проявляє виражену антигіпоксичну, анксиолітичну і протишокову дії, завдяки чому може стати перспективним засобом попередження нейрогенної дисфункції різного генезу [74, 75, 190].

Таким чином, відомі властивості карбацетаму дозволяють припустити можливість його використання для патогенетично обґрунтованої корекції нейрохімічного дисбалансу за умов діабетичного пошкодження сітківки.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота була виконана на кафедрі патофізіології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця і є

фрагментом кафедральної науково-дослідної роботи 0122U001308 (термін виконання 2022-2024 рр.), в якій дисертант є співвиконавцем.

**Мета дослідження** – вивчити механізми розвитку нейродегенерації сітківки при її діабетичному ураженні та обґрунтувати новий напрямок її патогенетичної корекції шляхом застосування агоністу ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетаму.

**Завдання дослідження:**

1. Виявити морфологічні ознаки нейродегенерації сітківки за умов її діабетичного пошкодження та вплив на неї введення інсуліну і комбінації інсуліну з агоністом ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетамом.

2. Визначити експресію специфічного нейронального маркера – нейроноспецифічної енолази (NSE) та вплив на неї введення інсуліну і комбінації інсуліну з агоністом ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетамом.

3. Визначити експресію маркера нервових волокон – нейрофіламентів (NF-H) та вплив на неї введення інсуліну і комбінації інсуліну з агоністом ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетамом.

4. Вивчити стан макроглії та апоптозу сітківки за експресією гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) і каспази-3 та вплив на них введення інсуліну і комбінації інсуліну з агоністом ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетамом.

5. Вивчити стан мікроглії сітківки за експресією білка S-100 та вплив на них введення інсуліну і комбінації інсуліну з агоністом ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетамом.

6. Визначити експресію маркера патологічного ангиогенезу – васкулоендотеліального фактору росту судин (VEGF) та маркера гіпоксії – гіпоксіяіндуцибельного фактору 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) та вплив на них введення інсуліну і комбінації інсуліну з агоністом ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетамом.



*Об'єкт дослідження:* нейродегенерація сітківки, що розвивається за умов її діабетичного ураження.

*Предмет дослідження:* морфологічні прояви нейродегенерації сітківки при розвитку експериментальної діабетичної ретинопатії; експресія маркерів нейродегенерації (NSE і NF-H), гліальної реакції (GFAP і S-100), апоптозу (каспаза-3), патологічного ангиогенезу (VEGF) і гіпоксії (HIF-1 $\alpha$ ) у сітківці; вплив застосування агоністу ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетаму на розвиток процесів нейродегенерації, експресію та вміст протеїнів у сітківці, прояви діабетичного ураження сітківки.

*Методи дослідження:* експериментальні (моделювання діабетичного ураження сітківки), біохімічні (вимірювання глюкози у крові), морфологічні (вивчення зрізів сітківки), імуногістохімічні (визначення експресії протеїнових маркерів у сітківці), імуноблотингові (визначення вмісту протеїнів у сітківці), статистичні.

#### **Наукова новизна отриманих результатів.**

Уточнено дані щодо раннього розвитку нейродегенерації при діабетичному ураженні сітківки. Вже через 7 діб моделювання ДР виявлено зниження щільності нервових клітин та розрихлення нервових волокон з подальшим наростанням розрідження клітин у ядерних шарах, гіпохромії нейронів з вакуолізацією цитоплазми, екстрацелюлярного набряку, зниженням щільності нервових волокон у плексиформних шарах. Гангліонарні клітини мали виражену вакуолізацію, а подекуди – гіперхромію цитоплазми, пікноз ядер. Ці зміни прогресували на тлі таких проявів ДР як набряк з ділянками ішемії, повнокрів'я і дилатація судин, утворення мікроаневризм у внутрішніх шарах (з 14-ї доби) та клітинних проліфератів у зовнішніх шарах сітківки (з 28-ї доби). Такі зміни визначали паралельний розвиток нейродегенерації з формуванням судинних і проліферативних аномалій у сітківці вже на ранніх термінах розвитку ДР.

Вперше встановлено, що лікування інсуліном покращувало стан сітківки, а додавання до його введення карбацетаму попереджало розвиток нейродегенеративних та інших проявів ДР.

Уточнено дані щодо експресії нейроноспецифічних білків у сітківці при її діабетичному ушкодженні. Виражене NSE-позитивне забарвлення мали гангліонарні клітини, нейрони внутрішнього та зовнішнього ядерних шарів та внутрішній сегмент фоторецепторів. З 14-ї доби інтенсивність забарвлення суттєво знижувалася, тоді як у внутрішньому ядерному шарі з'являлося фонове забарвлення з численними нервовими волокнами.

Вперше встановлено, що застосування інсуліну і, більшою мірою, інсуліну з карбацетамом сприяло зберіганню NSE-позитивних нервових клітин та зменшенню фонового забарвлення.

NF-H-позитивне забарвлення відмічене у поздовжніх нервових волокнах, які за морфологією відповідали аксонам горизонтальних та амакринових клітин; а також у волокнах та аксональних пагорбах гангліонарних нейронів. При розвитку ДР у плексиформних шарах сітківки спостерігалось прогресуюче зниження інтенсивності NF-H-позитивного забарвлення. У шарі нервових волокон забарвлені елементи концентрувалися навколо розширених мікросудин, які мали тенденцію до утворення мікроаневризм. На 28-му добу у внутрішньому плексиформному шарі було відмічено зникнення NF-H-позитивного забарвлення.

Вперше встановлено, що введення інсуліну сприяло менш вираженому зниженню інтенсивності NF-H-позитивного забарвлення, а введення карбацетаму запобігало його втраті у шарах сітківки: імуноспецифічні волокна зовнішнього плексиформного шару зберігали високу інтенсивність забарвлення, більш чітку структуру нервових сплетінь, які продовжувалися у внутрішній ядерний шар. Простежувалися аксони та аксональні пагорби у гангліонарних клітинах шару нервових

волокон.

Уточнено дані щодо реакції глії сітківки при розвитку ДР. За результатами імуногістохімічного виявлення GFAP вона характеризувалася поступовою активацією із першочерговим залученням астроцитів внутрішніх шарів сітківки, потім – клітин Мюллера (реактивний гліоз). GFAP-позитивні клітини тісно контактували з вогнищами патологічного ангиогенезу внутрішніх шарів сітківки, а також брали участь в утворенні клітинних проліфератів у зовнішніх шарах. Вміст GFAP у тканинах сітківки за результатами імуноблотингу суттєво зростає.

Вперше встановлено, що карбацетам знижував експресію та вміст GFAP і каспази-3 у сітківці та попереджував розвиток реактивного гліозу, ангиогенезу та утворення клітинних проліфератів.

Встановлено, що S100-позитивне забарвлення мали тіла численних поліморфних клітин внутрішнього ядерного шару та гліальні волокна, що муфтоподібно охоплювали тіла гангліонарних нейронів. При розвитку ДР інтенсивність S100-позитивного забарвлення клітин Мюллера значно зростала, чітко візуалізувалися їх довгі радіальні відростки. Інтенсивне забарвлення відмічено у зовнішньому ядерному шарі та на його межі з шаром паличок і колобочок, а також – у шарі гангліонарних клітин. На 28-у добу у внутрішніх шарах сітківки виявлялися мікроаневризми, з якими щільно контактували інтенсивно забарвлені S100-позитивні астроцитарні відростки.

Вперше встановлено, що застосування інсуліну призводило до послаблення інтенсивності S100-позитивного забарвлення, а комбіноване введення інсуліну і карбацетаму гальмувало експресію білка S100 і запобігало утворенню мікроаневризм сітківки. На 28-у добу забарвлення слабкої інтенсивності зберігалося тільки у поодиноких клітинах Мюллера внутрішнього ядерного шару та нервових сплетіннях у шарі гангліонарних волокон.

Уточнено дані щодо залучення у патогенез діабетичного ушкодження сітківки збільшення експресії VEGF і HIF-1 $\alpha$ . При розвитку ДР у тканинах сітківки суттєво зростає вміст VEGF. Його експресія була активована як у внутрішніх, так і у зовнішніх шарах сітківки у місцях утворення мікроаневризм та клітинних проліфератів.

Вперше встановлено, що при введенні інсуліну вміст VEGF був нижчим, ніж у контролі, а введення інсуліну з карбацетамом блокувало приріст вмісту VEGF у сітківці. Введення інсуліну і, більшою мірою, інсуліну з карбацетамом дозволило суттєво попередити розвиток ДР та знизити інтенсивність VEGF-позитивного забарвлення у всіх шарах сітківки. Вміст HIF-1 $\alpha$  у сітківці піднімався лише на 28-у добу, що значно зменшувалося при введенні інсуліну і карбацетами.

Таким чином, вперше відкритий ефект карбацетами зі зниженням експресії GFAP, каспази-3, VEGF та HIF-1 $\alpha$  при збільшенні експресії NSE і нейрофіламентів висвітлював важливу роль ГАМК-ергічного дисбалансу сітківки, а, з іншого боку, обґрунтував можливість його використання для запобігання нейродегенерації та збереження нейронів сітківки, гальмування надмірної активації глії, апоптозу та патологічного ангиогенезу при діабетичному ураженні сітківки. Препарат активно запобігав розвитку ранніх проявів ДР – реактивного гліюзу, ангиогенезу, клітинних проліфератів тощо.

### **Практична значимість отриманих результатів.**

У даному дослідженні показано попередження розвитку нейродегенерації у сітківці при введенні агоністу ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетами, що доводить важливу роль ГАМК-ергічного дефіциту при діабетичному ураженні сітківки. Збереження нейронів сітківки, гальмування надмірної активації глії, апоптозу та патологічного ангиогенезу є підставою для подальшої розробки цього напрямку патогенетичної корекції з метою запобігання розвитку процесів

нейродегенерації, а також попередження судинних і проліферативних патологічних процесів при ДР.

**Впровадження в практику.** Наукові результати даної дисертації було впроваджено в навчальний процес та наукову діяльність на кафедрах патологічної фізіології в Харківському національному медичному університеті, Тернопільському державному медичному університеті імені І.Я. Горбачевського, Одеському національному медичному університеті, Медичному інституті Сумського державного університету, Полтавському державному медичному університеті, Івано-Франківському національному медичному університеті, Буковинському державному медичному університеті, Львівському медичному університеті.

**Особистий внесок здобувача.** Визначення актуальності дослідження, наукової концепції дисертації, її дизайну, мети та завдань, узагальнення отриманих результатів, формулювання висновків здійснено здобувачкою разом із науковим керівником. Внесок здобувачки в аналіз літературних джерел, проведення експериментів, отримання та обробку результатів дослідження є основним. Експериментальна та дослідна частина роботи виконані здобувачкою самостійно. Морфологічні та імуногістохімічні дослідження виконано на базі кафедри патологічної анатомії Національного університету охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика (зав. – д.мед.н., проф. Дядик О.А.). Імуноблотингові дослідження виконано на базі відділу хімії ензимів та біохімії Інституту біохімії імені О.В. Палладіна НАН України (зав. – д.біол.н., ст.н.с. Тихомиров А.О.). Авторка самостійно виконала статистичний аналіз результатів дослідження. Дисертанткою не було використано результати та ідеї співавторів публікацій.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертаційної роботи були заслухані на: фаховому семінарі кафедри патофізіології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, протокол № 9 від 18.10.2024 р.; науковій конференції XXII читання ім. В.В.

Підвисоцького, м. Одеса (травень 2023 р.); VI науково-практичній internet-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція», м. Харків (листопад 2023 р.); XX Всеукраїнській науковій конференції «Актуальні питання біології та медицини», м. Лубни (травень 2024 р.); науковій конференції XXIII читання ім. В.В. Підвисоцького, м. Одеса (травень 2024 р.); IX Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю «Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України», присвяченому 100-річчю Української патологічної фізіології, м. Івано-Франківськ (вересень 2024 р.).

**Публікації.** Основні результати роботи оприлюднені в 10 наукових публікаціях. З них 5 робіт – статті в журналах відповідно до «Переліку наукових фахових видань України, в яких можуть публікуватися результати дисертаційних робіт на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук», у тому числі – 3 у виданнях, віднесених до бази даних Scopus; 5 робіт – тези у матеріалах науково-практичних конференцій.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація викладена українською мовою на 146 сторінках комп'ютерного тексту. Побудована за загальноприйнятою схемою і містить наступні розділи: вступ, огляд літератури, матеріал і методи дослідження, розділ з результатами власних досліджень, аналіз і узагальнення результатів дослідження, висновки, практичні рекомендації та список використаних джерел (містить 194 найменування, займає 25 сторінок), 2 додатки. Дисертація ілюстрована 24 рисунками.

## РОЗДІЛ 1

# ПРОБЛЕМА ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ ТА ДІАБЕТИЧНОГО УШКОДЖЕННЯ СІТКІВКИ. МЕХАНІЗМИ ТА МОЖЛИВОСТІ ПАТОГЕНЕТИЧНОЇ КОРЕКЦІЇ (огляд літератури)

### 1.1 Значення проблеми цукрового діабету та діабетичного ураження сітківки (діабетичної ретинопатії)

Серед неінфекційних захворювань цукровий діабет (ЦД) вийшов на перші позиції за медико-соціальною значущістю та останнім часом розглядається як пандемія XXI сторіччя [100]. Його поширеність у 2019 році складала понад 360 млн. осіб, що до 2030 року збільшиться вдвічі [113]. Найчастішою з причин інвалідизації у хворих на ЦД є офтальмологічні ускладнення, зокрема – ДР [13, 17, 27]. Ознаки ДР з'являються через 5-7 років захворювання, а через 30 років її мають майже всі хворі [34, 53].

ДР є основною причиною сліпоти серед людей віком понад 50 років [57, 64]. У 2020 р. кількість дорослих у всьому світі з ДР становила 103,12 млн., до 2045 року прогнозовано зростання цього показника до 160,5 млн. [149].

Уявлення про патогенез ДР по мірі накопичення наукових знань змінювалися. Запальна теорія, згідно якої ушкодження ока при ЦД розглядалося як наслідок запалення, доповнилася визнанням ролі судинної патології і, насамперед, – порушення мікроциркуляції сітківки та ендотеліальної дисфункції [73, 92, 93].

При ДР у сітківці розгортається цілий ряд подій, які характерні для

запалення – інфільтрація стінок судин запальними клітинами, збільшення проникності судин та тканинний набряк, активація утворення прозапальних цитокінів, апоптоз та втрата перицитів і ендотелію, патологічна неоваскуляризація [137, 167, 170]. Таке запалення має млявий хронічний перебіг і характеризується як метаболічне (метазапалення).

Ініціальні зсуви метаболізму та запальні реакції, які індукуються хронічною гіперглікемією, призводять до розвитку і прогресування пошкодження судин, яке починається з ендотеліальної дисфункції [21, 35, 43, 122].

За умов хронічної гіперглікемії в ендотелії капілярів сітківки розгортається каскад патологічних реакцій внаслідок глюкозотоксичності, інтенсифікації окисного стресу, надмірної дії стимулюючих гіпертензивних та запальних факторів, активаторів тромбоутворення [22]. У свою чергу ендотеліальна дисфункція включається в патогенез ЦД та ДР і викликає розвиток подальших метаболічних і запальних порушень.

Підсумовуючи дослідження останніх років можна вважати, що основними механізмами розвитку ДР є: хронічне метазапалення з індукцією активованими лейкоцитами експресії молекул адгезії, ушкодженням ендотеліоцитів окисними радикалами; синдроми вазорегресії та васкулярної обструкції з «протіканням» капілярів; збільшення продукції факторів росту, особливо, ендотеліального фактору росту; індукція оксидативного стресу; гіперекспресія прозапальних цитокінів; активація поліолового шляху метаболізму глюкози та збільшення продукції сорбітолу з порушенням внутрішньоклітинного осмотичного балансу; активація протеїнази С і матриксних металопротеїназ з деградацією міжклітинного матриксу [14, 38, 52].



## 1.2 Механізми процесів нейродегенерації при діабетичному ураженні сітківки

Оцінюючи патологічні зміни сітківки при ДР, слід визнати першочергове значення процесів нейродегенерації [10, 49, 50, 94]. Основну функцію органу зору виконують саме нервові елементи сітківки і, з анатомічної точки зору, око є відділом центральної нервової системи, який винесений на периферію та пристосований до сприйняття світлових хвиль. Отже, запальні та судинні зміни сітківки при ЦД мають значення з точки зору саме пошкодження нейронів, їх відростків та гліальних клітин.

У цьому плані необхідно зазначити, що при ЦД процеси нейродегенерації сітківки передують запальним та судинним порушенням [80]. Незалежно від інших проявів у сітківці розвиваються ознаки нейродегенеративного процесу:

- активація нейроглії з проявами нейронофагії (реактивний гліоз);
- втрата гангліонарних клітин;
- дегенерація та апоптоз нейронів, астроцитів та клітин Мюллера;
- порушення нейромедіаторних відносин (глутаматна ексайтотоксичність і ГАМК-ергічний дефіцит).

Логічним виглядає визнання ДР як сенсорної нейропатії, подібної до периферичної нейропатії при ЦД [26, 49, 50].

Серед механізмів, що обумовлюють пошкодження нервових клітин при ЦД, необхідно виділити низку метаболічних порушень, які, внаслідок великої чутливості енергетичного гомеостазу нейронів до гіпоксії, оксидативного стресу, екзо- та ендогенної інтоксикації, швидко пошкоджують нейрони та глію. Гіперглікемія активує низку метаболічних розладів, насамперед – надмірне утворення поліолів, кінцевих продуктів глікування, підвищення активності протеїнази С та гексозамінового шляху [104]. Всі ці процеси при початковій ДР безпосередньо пов'язані із

раннім розвитком оксидативного стресу.

Крім того, існує важливий специфічний процес пошкодження нейронів, який обумовлений розвитком глутаматної ексайтотоксичності [62]. Саме ранні нейрональні зміни при ЦД є наслідком порушення зворотного захоплення глутамату клітинами Мюллера та перетворення його у фізіологічний медіатор глутамін. Накопичення останнього зумовлює нейрохімічні кальцієві механізми пошкодження [80, 96, 117].

Видалення кальцію з нейронів здійснюється за рахунок енергії трансмембранного градієнта натрію, що підтримується енергетичними ресурсами клітини. Гіпоксічна деполяризація нейронів активує входження кальцію у клітину через потенціалзалежні канали, а глутамат – через хемозалежні, що підсилює деполяризацію. Надлишок глутамату в синапсах, в свою чергу, активує відповідні рецептори N-метил-D-аспартату (NMDA) і  $\alpha$ -аміно-3-гідроксі-5-метіл-4-ізоксазолпропіонової кислоти (AMPA), які сприяють надмірному притоку кальцію в нейрони. Це призводить до активації кальцієвих механізмів пошкодження клітини, поглиблення окисного стресу, спричиняє дисфункцію мітохондрій, інтенсифікацію перекисного окислення ліпідів, білків і ДНК, утворення у токсичних концентраціях оксиду азоту (NO) та пероксінітриту [75, 147].

Особливо треба відзначити пускову роль підвищення глутамату в позаклітинному середовищі. Аплікація глутамату в концентрації 10 мкмоль протягом п'яти хвилин викликає необоротні зміни нейронів у культурі. Цей ефект опосередкується активацією NMDA-рецепторів, що відкривають NMDA-залежні канали. Завдяки цьому натрій і кальцій спрямовуються по градієнту концентрації з позаклітинного простору в нейрон з розвитком електролітно-осмотичних порушень та внутрішньоклітинного набряку. У сітківці за умов ЦД до такого пошкодження найбільш схильні гангліонарні та амакринові клітини [15, 96, 176].

Кальцієві та оксидативні механізми пошкодження нейронів при ЦД призводять до мітохондріальної дисфункції та запуску внутрішнього шляху апоптозу [41, 82]. Дегенерація та апоптоз ганліонарних клітин сітківки у хворих на ДР були пов'язані з рівнем експресії каспази-9 та -3 [72, 147, 150, 153]. Ще до розвитку ознак ДР у хворих на ЦД мало місце витончення всіх шарів сітківки у фовеальній зоні, зниження її загальної товщини з витонченням зовнішніх шарів [66, 135].

### **1.3 Значення окремих маркерів патологічних процесів при діабетичному ушкодженні сітківки**

#### *Нейроноспецифічна енолаза (NSE)*

Енолаза (ЕС 4.2.1.11) є добре відомим гліколітичним ферментом, який каталізує перетворення 2-фосфогліцерату у фосфоенолпіруват і його зворотну реакцію під час глікогеногенезу [177]. Енолаза бере участь у гліколітичному шляху, який розкладає глюкозу на піруват і виробляє як високоенергетичні сполуки АТФ, так і кофактор NADH, забезпечуючи енергетичну основу клітинного метаболізму. Дослідження показали, що енолаза, а також піруваткіназа та гексокіназа можуть домінувати в метаболічному внеску при запаленні та сприяти проліферації пухлини в умовах гіпоксії шляхом підвищення гліколізу [28, 124].

Гама-енолаза обмежується нейрональними клітинами та має назву нейроноспецифічна енолаза (NSE), тоді як альфа-енолаза обмежена гліальними клітинами (ненейронна енолаза, NNE) [86]. У сітківці NSE присутня в нейронах і міжфоторецепторному матриксі, а її фізіологічну роль пов'язують з регуляцією росту та розвитку нервових клітин [184]. У нормі експресія NSE знаходиться на низькому рівні, тоді як при пошкодженні нервових клітин в результаті ішемії, гіпоксії або гіперперфузії

NSE може вивільнятися з клітин у великих кількостях і, навіть, надходити в кровотік через пошкоджений гематоенцефалічний бар'єр, що призводить до підвищення рівня NSE в крові [127].

У хворих на ДР визначені високі рівні NSE у сироватці та склоподібному тілі, що тісно пов'язане з тяжкістю ДР [184]. Крім того, NSE є специфічним маркером ушкодження нейронів при багатьох захворюваннях нервової системи і може точно відбивати ушкодження нейронів та мозкової тканини. Підвищення рівня NSE у зразках сітківки свідчить про пошкодження нейронів сітківки, дисфункцію та пошкодження фоторецепторів, набряк та дезорганізацію у фоторецепторному шарі та інтерпретується як маркер дистресу нейронів сітківки [12]. Рівень сироваткової NSE при ДР суттєво підвищений, що може бути підставою для визнання її у якості потенційного біомаркера тяжкості ДР [20, 79, 184].

### *Нейрофіламенти*

Нейрофіламенти (NF) є гетерополімерами, що складаються з чотирьох субодиниць – легких (NF-L), середніх (NF-M), важких (NF-H) і  $\alpha$ -інтернексину [186]. Вони забезпечують структурну підтримку високоасиметричної геометрії нейронів і, особливо, – радіального розширення мієлінізованих аксонів, що має вирішальне значення для ефективності нервової провідності. Разом з компонентами цитоскелету, включаючи мікротрубочки, нитки актину та інші волокнисті цитоскелетні елементи, вони створюють регіональну спеціалізовану мережу [186]. Складний патерн фосфорилування та дефосфорилування на кожній субодиниці нейрофіламентів модулює складання ниток, оборот та організацію в цитоскелеті аксонів.

Імуногістохімічно у сітківці дорослого кроля нейрофіламенти (переважно NF-L) виявлялися у горизонтальних клітинах А- та В-типу [83]. У вигляді еозинофільних тілець нейрофіламенти спостерігалися у

нейритах горизонтальних клітин внутрішнього ядерного шару та зовнішнього плексиформного шару передньої дорсальної області сітківки у новозеландських білих, японських білих і голландських кроликів [69]. У сітківці мавп експресія нейрофіламентів, як аксонального маркера, була рівномірно розподілена у шарі Генле [66]. У щурів NF-L виявлялися у аксонах гангліонарних клітин та у інших нейронах сітківки [95].

У сітківці кроля NF-H-імунопозитивні волокна були виявлені у плексиформних шарах та шарі нервових волокон [159]. У внутрішньому плексиформному шарі їх ідентифікували як аксони горизонтальних клітин, а закінчення аксонів і волокна в шарі нервових волокон – як аксони гангліонарних клітин. Мічені волокна в зовнішньому плексиформному шарі були досить численними та зазвичай дуже тонкими, менш ніж 1 мкм у діаметрі, їх часто можна було простежити на відстані понад 1 мм, оскільки вони проходили збоку через сітківку. Вони були ідентифіковані як аксони амакринових клітин.

При ДР вміст у сироватці крові пацієнтів з ЦД NF-L і GFAP були визначені як біомаркери нейрозапальних і нейродегенеративних процесів [63].

#### *Гліальний фібрилярний кислий протеїн (GFAP)*

У відповідь на накопичення токсичних метаболічних продуктів у діабетичній сітківці відбувається проліферація мікроглії та її трансформація від протизапального до прозапального стану [56]. Активована мікроглія залучає клітини Мюллера та астроцити, які в нормі знаходяться у стані спокою, що супроводжується розвитком реактивного гліозу, маркером якого є GFAP [144]. У свою чергу реактивний гліоз посилює надекспресію прозапальних цитокінів, збільшує проникність мікросудин сітківки та проліферацію ендотелію в ішемізованих ділянках [179]. Хронічна або надмірна активація гліальних клітин Мюллера має суттєву токсичну дію на гангліонарні клітини [110].

Астроцити сітківки в нормі експресують GFAP, у той час як у клітинах Мюллера ця експресія значно нижча, при ЦД мюллерівські клітини виявляють аберантну надекспресію GFAP [31].

У експериментальних дослідженнях констатовано підвищену експресію GFAP, який вважають маркером реактивного гліозу в сітківці [78, 162]. В астроцитах під дією гіперглікемії значно посилюється експресія прооксидантів – індукованої NO-синтази (iNOS) та білка Nox2 [46]. Згодом кількість астроцитів у пацієнтів з ДР зменшується, про що свідчить зниження експресії GFAP, внаслідок чого відбувається порушення гематоретинального бар'єру та судинний витік у сітківці [111].

#### *Білки S-100*

Як вже було зазначено, найважливішим нейрохімічним механізмом при ДР є ексайтотоксичність надмірного глутамату, що підсилює процеси метаболізму, каспазного каскаду й апоптозу [40]. В експериментальних моделях ЦД на гризунах було показано зниження вивільнення гамма-аміномасляної кислоти (ГАМК) у сітківці, посилення ефектів глутамату та зниження сигналізації дофаміну, що свідчило про специфічний дефіцит нейронів сітківки [40]. Глутамат-опосередкована збуджуюча та ГАМК-опосередкована гальмівна синаптичні передачі важливі для підтримки балансу збудження/гальмування в нервовій системі, баланс між ними є важливим способом запобігання підвищеній збудливості нейронів, у той час як ішемія та гіпоксія сітківки при ЦД можуть призводити до загибелі нейронів [44]. Субодиниці ГАМК-рецепторів виявлені на всіх нейронах сітківки, включаючи амакринові та гангліонарні [120]. В умовах ЦД виявлено зниження активності та експресії рецепторів ГАМК у сітківці, при їхньому блокуванні загибель гангліонарних клітин прискорювалася [98].

Білки, що зв'язують кальцій є членами гетерогенної родини білків, здатних буферизувати внутрішньоклітинну концентрацію іонів кальцію

[41, 82]. Вони експресуються в центральній і периферичній нервовій системі, включаючи субпопуляцію нейронів сітківки, де здатні захищати клітини від токсичного збільшення внутрішньоклітинного кальцію.

Родина білків S100 складається з 24 членів, функціонально розподілених на три основні підгрупи: ті, які здійснюють лише внутрішньоклітинні регуляторні ефекти, ті, що мають внутрішньоклітинні та позаклітинні функції, і ті, які в основному здійснюють позаклітинні регуляторні ефекти [174]. У клітинах білки S100 регулюють проліферацію, диференціювання, апоптоз, гомеостаз кальцію, енергетичний метаболізм, запалення та міграцію. Білки S100 є лігандами для багатьох рецепторів і, у тому числі, – рецептора кінцевих продуктів прогресивного глікування (RAGE).

Білки S100 збільшують інфільтрацію мікроглії та макрофагів у мишачій моделі ДР, також повідомлялося про збільшення рівнів білків S100A8 та S100A9 у плазмі пацієнтів із ЦД, що корелювало з тяжкістю ДР [81, 156]. Білки S100 (S100A7, S100A12, S100A8/A9 і S100B) взаємодіють з RAGE і активують інфламасому [174]. Таким чином, білок S100 (S100A12) можна вважати прозапальним тригером в індукованій гіперглікемією активації глії сітківки та запаленні [48].

#### *Васкулоендотеліальний фактор росту судин (VEGF)*

Встановлено, що взаємозалежно з розвитком порушень кровообігу формується нейродегенерація сітківки, яка за морфологічними проявами навіть може передувати мікросудинним змінам [133]. Скануюча лазерна поляриметрія та оптична когерентна томографія ідентифікують втрату гангліозних клітин сітківки одночасно зі зменшенням товщини шару нервових волокон ще за відсутності будь-якого мікросудинного дефіциту [133, 139]. Нейродегенерація сітківки проявляється апоптозом нейронів і реактивним гліозом, що доповнює порушення функціонування ретинальної нейроваскулярної одиниці та, у свою чергу, посилює розвиток вазорегресії

[128, 129].

VEGF, який є кінцевим продуктом активації різних сигнальних шляхів, вважається основним фактором розвитку ДР [102]. Він посилює процеси проліферації ендотеліоцитів, неоваскуляризації, підвищення чутливості судин, утворення колатералей, і, відповідно, усунення ішемії [90]. Важливою властивістю VEGF-A є його роль у якості фактора активності фоторецепторів і клітин Мюллера в умовах нормальної базової секреції [90, 182].

При посиленні цитокін-опосередкованих запальних реакцій у діабетичній сітківці активується проліферація мікроглії та її трансформація від протизапального до прозапального стану [188]. Пізніше відбувається залучення клітин Мюллера та астроцитів, що в нормі знаходяться у стані спокою та підтримують місцеві нейрональні функції у здоровій сітківці. Це призводить до розвитку реактивного гліозу, помітного по активізації GFAP [144].

Реактивний гліоз пов'язаний також й з підвищеною експресією VEGF і, у свою чергу, призводить до надекспресії прозапальних цитокінів, що викликає посилення витоку мікросудин сітківки і їх проліферацію в ішемізованих ділянках [178].

При тяжкій гіпоксії експресія як гіпоксичних (HIF-1 $\alpha$ ), так і ангіогенних факторів (VEGF) суттєво підвищується в тканині сітківки гризунів [68]. Більш того, при тяжкій гіпоксії в результаті пошкодження мітохондрій апоптоз відбувається в гангліонарних клітинах і гліальних клітинах Мюллера, що призводить до підвищеного вивільнення цитохрому С з мітохондріальної пори в цитозоль і подальшої активації цитозольної каспази-3, що, в свою чергу, призводить до індукції апоптозу [67].

Таким чином, дослідження патогенезу процесів нейродегенерації при діабетичному ураженні сітківки є актуальним дослідженням, яке дозволить обґрунтувати нові напрямки патогенетичної корекції, зокрема, –



відновлення нейрохімічного балансу.

#### **1.4 Напрямки патогенетичної корекції нейродегенерації сітківки**

Відповідно до наведеного, ідеологія патогенетичного лікування ДР має передбачати застосування елементів нейропротекції [42, 47, 99, 128]. Метою такого впливу має бути переривання швидких реакцій глутамат-кальцієвого каскаду і блокада пошкоджуючих вільнорадикальних механізмів, а згодом – зниження продукції прозапальних цитокінів, прооксидантних ферментів і переривання апоптозу нейронів. Гіпоксія сітківки посилює розвиток локального запалення і реакції гліальних клітин, викликає дисбаланс цитокінів. Ці процеси спричинюють порушення мікроциркуляції, змінюють проникність гематоретинального бар'єру, що у результаті призводить до пошкодження нейронів.

Оксидантний стрес, гіперактивність системи NMDA-рецепторів, продукція прозапальних цитокінів гліальними клітинами є основними патогенетичними ланками формування нейродегенерації при ДР. Системний огляд літератури Qiuhua Shen et al. (2016) показав, що антиоксидантна терапія (амінокислоти, вітаміни С та Е, прогестерон, N-ацетилцистеїн, ензогенол та інші) може бути безпечною та ефективною допоміжною терапією, яка послаблює окислювальний стрес [105].

В основі нейропротекції лежить послаблення ранніх оксидативних ушкоджень нейронів за рахунок інтенсифікації протективних механізмів, обумовлених інактивацією потенціалзалежних  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів, іонних каналів NMDA-рецепторів і активацією в постсинаптичних нейронах бета-ізоформи протеїнкінази С [125, 158, 171].

Глутамат є медіатором передачі імпульсу з паличок і колбочок та викликає гіперполяризацію постсинаптичної мембрани, а, з іншого боку, є

попередником ГАМК. Остання є основним гальмівним медіатором у ЦНС ссавців та бере участь у передачі сигналу з горизонтальних клітин сітківки на фоторецептори. Посилення гальмівного впливу ГАМК може приводити до функціональної блокади та розвантаження амакринових та гангліонарних клітин [44]. Ці міркування можуть стати обґрунтуванням для використання ГАМК-ергічних препаратів при ДР.

У світовій літературі щорічно з'являються нові бензодіазепінові препарати, що мають антиоксидантну дію. Серед них значної уваги заслуговує карбацетам, розроблений в Інституті фізико-органічної хімії та вуглехімії НАН України. Препарат належить до ендogenous модуляторів ГАМК-бензодіазепінового рецепторного комплексу, похідних  $\beta$ -карболіну та представляє собою карболіновий ізостер (1-оксо-3,3,6-триметил-1,2,3,4-тетрагідроіндоло [2,3-с]хінолін);  $\beta$ -карболінова структура є основою для алкалоїдів ( $\beta$ -карболінів), які виділені з рослини – гармали звичайної (*Peganum harmala*).

За антиамнестичною активністю карбацетам в 100 разів, а за антигіпоксичною – у 29-35 разів перевершує пірацетам, що є класичним препаратом з ноотропною дією. Встановлено, що карбацетам проявляє виражену антигіпоксичну, анксиолітичну і протишокову дії, завдяки чому може стати перспективним засобом попередження нейрогенної дисфункції різного генезу [74, 75, 190]. Карбацетам забезпечує зниження інтенсивності ліпідної пероксидації, покращення антиоксидантного захисту, зменшення інтенсивності ендотоксикозу та вмісту маркерів цитолізу, що свідчить про менші прояви вторинних механізмів пошкодження [74, 75]. Такі властивості карбацетаму обґрунтовують його можливе використання і для корекції нейрохімічного дисбалансу при ДР.

## Резюме

Серед неінфекційних захворювань ЦД вийшов на перші позиції за медико-соціальною значущістю та має всі ознаки пандемії. Найчастішою з причин інвалідизації при ЦД є офтальмологічні ускладнення, зокрема – ДР. Основними відомими механізмами розвитку ДР є хронічне метазапалення з накопиченням продуктів патологічного метаболізму і інтенсифікацією окисного стресу, індукцією експресії прозапальних молекул, розвитком вазорегресії та «протіканням» капілярів, активація протеїнкінази С і матриксних металопротейназ з деградацією міжклітинного матриксу. З іншого боку, останнім часом доведений незалежний розвиток процесів нейродегенерації сітківки, які передують запальним та судинним порушенням. Незалежно від інших проявів у сітківці розвиваються певні ознаки нейродегенеративного процесу: активація нейроглії з проявами нейронофагії (реактивний гліоз), втрата гангліонарних клітин, дегенерація та апоптоз нейронів, астроцитів та клітин Мюллера, порушення нейромедіаторних відносин (глутаматна ексайтотоксичність і ГАМК-ергічний дефіцит). Гіперглікемія активує низку метаболічних і нейрохімічних розладів у сітківці, що викликає певний медіаторний дисбаланс. Ці міркування є обґрунтуванням для використання ГАМК-ергічних препаратів при ДР. Серед таких уваги заслуговує ендогенний модулятор ГАМК-бензодіазепінового рецепторного комплексу, похідне  $\beta$ -карболіну карбацетам, розроблений в Інституті фізико-органічної хімії та вуглехімії НАН України. Відомі властивості карбацетаму дозволяють припустити можливість його використання для патогенетично обґрунтованої корекції нейрохімічного дисбалансу за умов діабетичного пошкодження сітківки.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### **2.1 Утримання тварин та моделювання діабетичного пошкодження сітківки. Дизайн дослідження**

При проведенні досліджень суворо дотримувалися принципів Директиви 2010/63 ЄС із захисту тварин, Гельсінкської декларації (2008), вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№1759-VI від 15.12.2009), а також Експертного висновку Комісії з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (протокол № 164 від 21.11.2022 р.). Тварин розмножували та утримували у віварії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

Для моделювання діабетичного пошкодження сітківки була обрана класична модель ЦД 1-го типу із введенням стрептозотоцину [55]. Останній у дозі 50 мг/кг призводив до масової загибелі бета-клітин підшлункової залози та розвитку стабільної гіперглікемії, що супроводжувалося розвитком ранніх специфічних проявів у сітківці, характерних для ДР [6, 54].

Для реалізації моделі було використано 65 тримісячних щурів-самців лінії Вістар масою 140-160 г. Тварин було ретельно оглянуто перед дослідженням, відбирали тільки візуально здорових щурів з активною поведінкою, без ознак запальних процесів, неврологічних розладів та інших захворювань. Тварин розсаджували у клітки по 3-4 особини та тримали в умовах віварію на стандартному раціоні при вільному доступі до їжі та води.

За день до експерименту згідно до рекомендацій [54] тварин не годували, в ранковий час (9.00-10.00) після зважування та розрахунку дози внутрішньоочеревинно вводили стрептозотоцин (50 мг/кг; “Sigma-Aldrich”, Китай). Стрептозотоцин дозували та розчиняли безпосередньо перед введенням. Флакон, який згідно рекомендаціям фірми-виробника зберігався при  $-20^{\circ}\text{C}$ , витримували при кімнатній температурі 15-20 хвилин, після чого відміряли необхідну кількість препарату на торсійних вагах ВТ-500 (Україна). Препарат розчиняли у холодному 0,1М цитратного буферу (рН 4,5), робоча концентрація розчину для введення на 100 г ваги тіла щура складала 5 мг/0,5 мл. Після ін’єкції тварин протягом дня не годували, а у воду для пиття додавали глюкозу до 5% (5 г на 100 мл).

Всього у дослідженні використано 65 щурів: 60 особинам було введено стрептозотоцин, а ще 5 особинам – тільки буфер для розчину (контроль введення стрептозотоцину). Тварин, яким було введено стрептозотоцин, рандомізовано розділили на 3 групи (по 20 тварин; рис. 2.1):

- в 1-й (контроль лікування) вводили 0,5 мл фізіологічного розчину;
- у 2-й вводили інсулін (Actrapid HM Penfill, “Novo Nordisk A/S”, Данія) у дозі 150 Од/кг;
- в 3-й разом з інсуліном вводили карбацетам (5 мг/кг в 0,5 мл фізіологічного розчину).

Препарати вводили внутрішньоочеревинно через день, починаючи з 7-го дня після ін’єкції стрептозотоцину.

Карбацетам – карболіновий ізостер (1-оксо-3,3,6-триметил-1,2,3,4-тетрагідроіндоло[2,3-с]хінолін) був синтезований у відділі хімії біологічно активних сполук Інституту фізико-органічної хімії та вуглехімії імені Л.М. Литвиненка НАН України (Київ, Україна) під керівництвом доктора хімічних наук, старшого наукового співробітника С.Л. Богзи.

<b>65 щурів-самців, 140-160 г</b>			
<b>60 щурів – моделювання ЦД та ДР</b> (ін'єкція стрептозотоцину, 50 мг/кг)			<b>5 щурів</b> (контроль введення стрептозотоцину)
<b>1-а група,</b> контроль введення препаратів, 0,5 мл фізіологічного розчину, в/оч	<b>2-а група,</b> введення інсуліну, 150 Од/кг, в/оч	<b>3-я група,</b> введення інсуліну (150 Од/кг, в/оч) та карбацетаму (5 мг/кг, в/оч)	
<b>n=20</b>	<b>n=20</b>	<b>n=20</b>	
виведення з експерименту та отримання матеріалу для проведення морфологічних, імуногістохімічних та імуноблотингових досліджень (7-а, 14-а, 21-а та 28-а доба)			

Рис. 2.1 Загальний дизайн дослідження.

в/оч – внутрішньоочеревинне введення.

Вміст глюкози контролювали за допомогою глюкометра та одноразових тест-смужок (ACCU-Chek Instant, “Roche”, Німеччина) у крові, забраної з хвостової вени натще. У тварин всіх груп протягом спостереження вміст глюкози у крові був стабільно високим та на 28-у добу у контрольній групі становив  $29,32 \pm 1,25$  ммоль/л, у 1-ї та 2-ї групах  $17,02 \pm 1,03$  і  $14,38 \pm 1,25$  ммоль/л відповідно ( $P < 0,05$  порівняно з контрольною групою).

В жодної тварини з групи контролю дії стрептозотоцину вміст глюкози у крові не перевищував  $6,2$  ммоль/л протягом всього спостереження.

Протягом експерименту у тварин спостерігалася спрага та збільшення діурезу, що підтверджувало розвиток гіперглікемії. Як видно з рис. 2.2, щури контрольної групи постійно групувалися навколо поїлок з водою, тоді як щури, які отримували інсулін, споживали води менше. Поведінка щурів, які отримували інсулін з карбацетамом, не відрізнялася

від такої інтактних тварин.

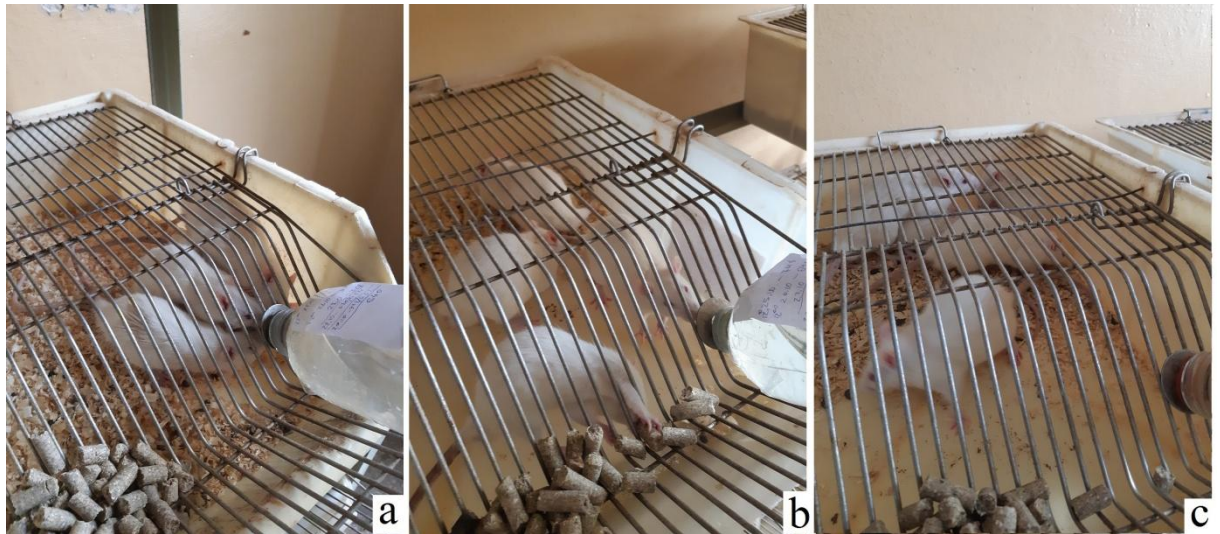


Рис. 2.2. Типова поведінка тварин після введення стрептозотоцину;  
 а – група контролю лікування;  
 б – група з введенням інсуліну;  
 с – група з введенням інсуліну і карбацетаму.

Тварин через 7, 14, 21 і 28 днів у кількості по 5 особин у кожній групі виводили з експерименту смертельною ін'єкцією тіопенталу (75 мг/кг) та декапітацією.

## 2.2 Морфологічні та імуногістохімічні дослідження

Безпосередньо після декапітації проводили енуклеацію. Очі фіксували в 10 %-му розчині нейтрального забуференого формаліну (рН 7,4) протягом не менш 24-36 годин, матеріал обробляли за стандартною методикою та заливали в парафін. З парафінових блоків виготовляли серійні гістологічні зрізи товщиною 2-3 мкм на ротаційному

мікротомі HM 325 (Thermo Shandon, Англія). Зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином для проведення оглядової мікроскопії (рис. 2.3). Сітківка щура мала типову будову шарів, добре диференціювалися шар фоторецепторів із зовнішнім та внутрішнім сегментами.

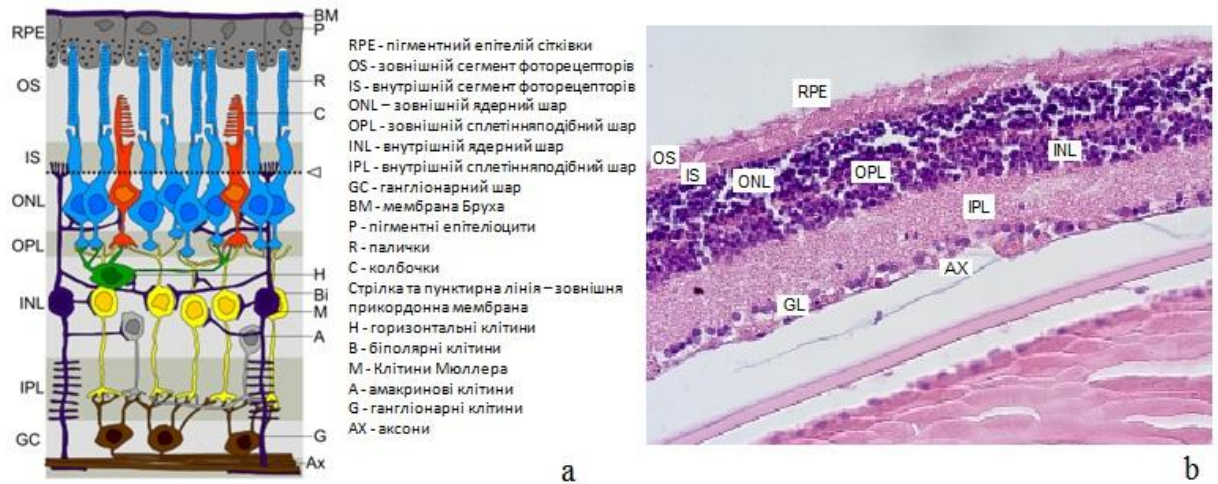


Рис. 2.3. Будова сітківки щура. а – схематичне зображення (за Т. Léveillard, 2022); б – препарат сітківки інтактного щура, забарвлення гематоксилін-еозин;  $\times 200$ .

Зовнішній ядерний шар мав щільно розташовані округлі інтенсивно базофільні клітини. Зовнішній плексиформний (сплетінняподібний) шар мав незначну товщину та візуалізувався у вигляді оксифільної безперервної стрічки з кровоносними судинами. У внутрішньому ядерному шарі відмічалася велика кількість поліморфних клітин, переважно округлих, а також веретеноподібних та відросткових. Найбільшу товщину мав внутрішній плексиформний шар, в якому відмічено окремі округлі або полігональні клітини різного розміру та велика кількість різноспрямованих нервових волокон, що утворювали щільні сплетіння. Шар гангліонарних клітин був представлений тілами крупних нейронів, що мали аксональний пагорб та відросток, який продовжувався у шар нервових волокон.



Принцип імуногістохімічного дослідження полягав у імуноспецифічному зв'язуванні антигену (відповідного білка) на серійних зрізах тканини сітківки з первинними антитілами, наступним зв'язуванням з кон'югатом, що містив пероксидазу хрому (вторинні антитіла) та проведенням кольорової реакції (рис. 2.4).

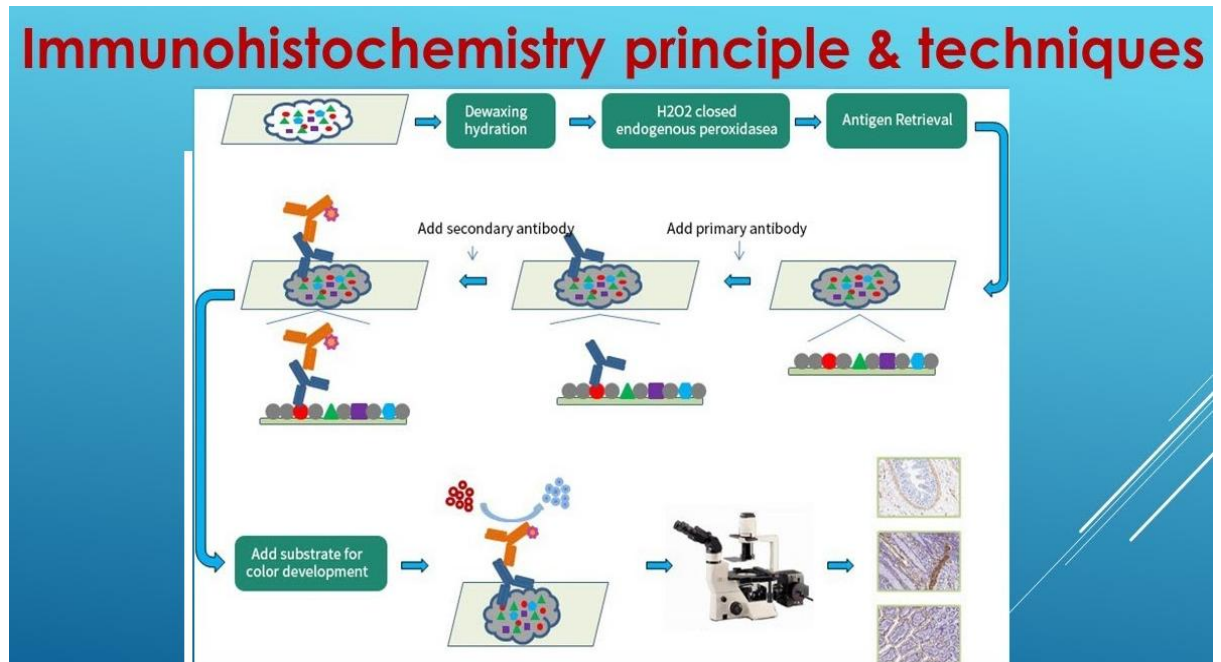


Рис. 2.4. Етапи імуногістохімічного дослідження з виявлення білків на зрізах сітківки.

Для імуногістохімічного дослідження використані моноклональні мишині антитіла до білків щура: NSE (Neuron Specific Enolase, gamma, Monoclonal Antibody, “Invitrogen, ThermoFisher Scientific”, Waltham, США), NF-H (Neurofilaments 70/200 kDa, Monoclonal antibody, 2F11, “Invitrogen, ThermoFisher Scientific”, Waltham, США), GFAP і каспази-3 (“ThermoFisher Scientific”, США), S-100 (клон 4Cu9, “Master Diagnostica”, США) та VEGF (Monoclonal Antibody VG1, “Invitrogen”, США).

Для проведення дослідження зрізи поміщалися на адгезивні скельця

Super Frost Plus (Menzel, Німеччина). Для високотемпературної обробки епітопів антигенів застосовували цитратний буфер з рН 6,0, EDTA-буфер рН 8,0, систему детекції Vitro Master Polymer Plus Detection System (Peroxidase), що у якості хромогену включала діметиламінобензол (Quanto Master Diagnostica, Іспанія).

Оцінку інтенсивності забарвлення проводили згідно рекомендаціям D. Dabbs (2014) на підставі візуально-аналогової шкали (рис. 2.5) [36].

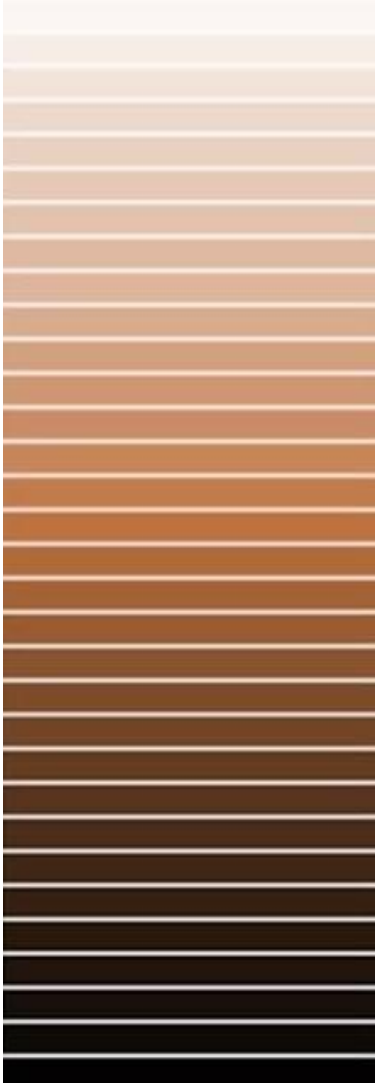
Знакова система оцінки (+/-)	Бальна система оцінки (бали)	Кольорова шкала інтенсивності забарвлення
«-»	0 балів	
«+»	1 бал	
«++»	2 бали	
«+++»	3 бали	

Рис. 2.5. Візуально-аналогова шкала інтенсивності забарвлення при імуногістохімічному дослідженні за D. Dabbs [36].

Згідно до цієї системи оцінки: 0 балів – забарвлення відсутнє; 1 бал (+) – слабка інтенсивність забарвлення; 2 бали (++) – середня інтенсивність забарвлення; 3 бали (+++) – висока інтенсивність забарвлення. Зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном.

Мікроскопічне дослідження та фотоархівування проводили із використанням світлооптичних мікроскопів «ZEISS» (Німеччина) з системою обробки даних «AxioImager. A2» при використанні об'єктивів зі збільшенням 5x, 10x, 20x, 40x, біноклярної насадки зі збільшенням x1,5 та окулярів – x10 з камерою ERc 5s, «Carl Zeiss» Primo Star з камерою Axiosam105 color.

На рис. 2.6 наведені приклади проведення імуногістохімічного аналізу у інтактних тварин. Специфічний характер розподілу імунопозитивного матеріалу підтверджував правильність виконання методики.

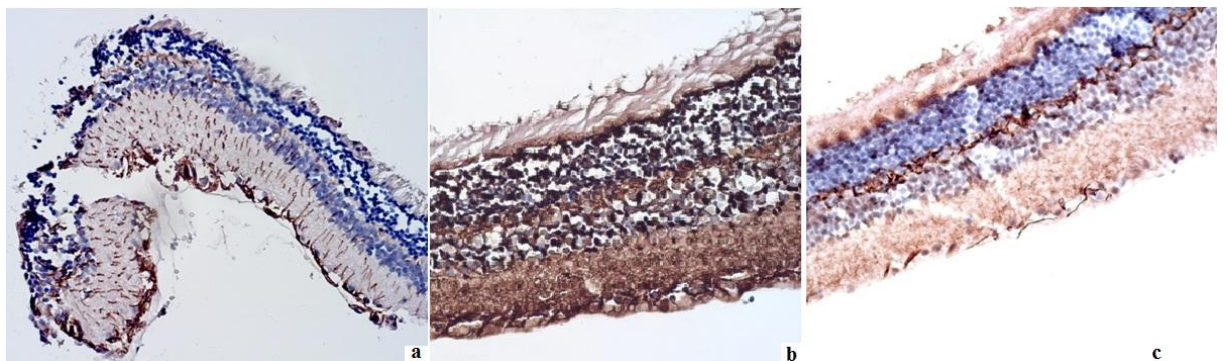


Рис. 2.6. Репрезентативні результати імуногістохімічного виявлення GFAP (a), S-100 (b) та NF-H (c); дозабарвлення гематоксиліном;  $\times 200$ .

Коричневе GFAP-імуноспецифічне забарвлення з інтенсивністю 2-3 бали за шкалою D. Dabbs чітко візуалізувалося в тілах окремих клітин зовнішнього сплетінняподібного шару та, меншою мірою, – у внутрішньому ядерному шарі (див. рис. 2.6 а). Інтенсивно забарвлювалися

численні відростки клітин Мюллера, що радіально перетинали внутрішній сплетінняподібний шар. Також спостерігався інтенсивно забарвлений шар нервових волокон.

Інтенсивне забарвлення відмічено при дослідженні білка S-100 (див. рис. 2.6 b). Виявлялися довгі тонкі цитоплазматичні відростки клітин Мюллера, які утворювали внутрішню та зовнішню прикордонні мембрани. Тіла клітин Мюллера виявлялися у ядерних шарах. Інтенсивність імуноспецифічного забарвлення сітківки на білок S100 дуже висока (за шкалою D. Dabbs становила 3 бали).

Чітко виявлялися численні переплетіння нейрофіламентів (NF-H) у сплетінняподібних шарах сітківки, більшою мірою – у зовнішньому шарі, де інтенсивність забарвлення за шкалою D. Dabbs становила 3 бали. У внутрішньому ядерному шарі слабо забарвлювалися тіла нейронів. Також слабо забарвленою була цитоплазма гангліонарних клітин.

### **2.3 Дослідження методом імуноблотингу**

Для проведення досліджень методом імуноблотингу тканину сітківки на холоді ретельно відділяли від інших тканин ока, поміщали у заздалегідь промарковані мікропробірки та терміново заморожували у рідкому азоті.

#### *Пробопідготовка*

Зразки тканини подрібнювали у порцеляновій ступці зі скрапленням азотом і гомогенізували у лізуючому буфері наступного складу: 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 0,15 М NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 1% NP-40, 5 мМ ЕДТК, та додавали коктейль інгібіторів фосфатаз та протеаз (Pierce Protease and Phosphatase inhibitor, ThermoScientific, США, #A32961). Співвідношення «тканина : буфер» становило 1:5.

Після гомогенізації зразки додатково дезінтегрували ультразвуком та

центрифугували при 16 тис. g протягом 45 хв. при 4°C. Супернатанти відбирали, переносили до пластикових пробірок типу «Епендорф» та вимірювали в них концентрацію загального протеїну спектрофотометрично за методом С.М. Stoscheck [140]. Зразки протеїнів для проведення електрофорезу готували з використанням буферу Леммлі, що мав наступний склад: 62,5 мМ Tris-HCl, рН 6,8, 0,1% SDS, 10% β-меркаптоетанол, 10% гліцерол 0,001% бромфеноловий синій, у співвідношенні супернатант : буфер Леммлі – 2 : 1. Після приготування суміші прогрівали при 95°C протягом 5 хв.

*Електрофорез в поліакриламідному гелі (РААГ) за присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE)*

Електрофорез у 8% РААГ за присутності 0,1% SDS проводили за класичною методикою [76]. Для проведення електрофорезу використовували камеру для вертикального гель-електрофорезу виробництва BioRad (США). Для полімеризації акриламід у при формуванні концентруючого (рН 6,8) та розділяючого гелів (рН 8,8) використовували TEMED та 10%-й розчин персульфату амонію. Концентрація протеїнів становила 75 мкг на доріжку гелю. Буферний розчин, який містив 25 мМ трис-HCl (рН 8,3), 0,192 М гліцин та 0,1% SDS, використовували як електродний буфер. Концентрування зразків проводили при напрузі 30-35 В (сила струму 15-18 мА), розділення – 45-50 В (30-35 мА). Після закінчення електрофоретичного розділення гелі обережно виймали з камери і промивали у трансфер-буфері, що містив 25% метанолу, та використовували для проведення імуноблот-аналізу.

*Імуноблотинг*

Імуноблот-аналіз досліджуваних протеїнів проводили за методикою [152] з мінорними модифікаціями. Після електрофоретичного розділення протеїни з гелю переносили на нітроцелюлозну мембрану шляхом електроблоту, використовуючи буферний розчин, що містив 0,025 М Tris-

HCl, 0,192 M гліцин та 25% метанол. Напруга при переносі складала 35-45 В при силі струму 200-230 мА, тривалість переносу – 120 хв.

Після переносу мембрани блокували у 5% розчині знежиреного сухого молока у забуференому фізіологічному розчині (PBS), що містив 0,05% Triton X-100 (PBST) протягом 90 хв. за 37°C, після чого їх інкубували з відповідними первинними антитілами, взятими у розведеннях згідно з рекомендаціями виробника.

У роботі використовували наступні первинні антитіла: кролячі anti-GFAP (Santa Cruz Biotechnology, США, кат. № sc-9065), мишачі anti-VEGF (Invitrogen, США, no. MA5-12184, 1:3,000 diluted), кролячі anti-HIF-1 $\alpha$  (Sigma Aldrich, США, no. HPA001275, 1:2,500 diluted). Кролячі anti-actin (Abcam, США, кат. № ab20272) та щурячі anti-tubulin [YL1/2] (Abcam, США, кат. № ab6160) використовували для детекції актину або тубуліну як контроль нанесення протеїну (loading control).

Після інкубації з первинними антитілами мембрани відмивали 6 разів по 7 хв. PBST для видалення неспецифічно зв'язаних антитіл та обробляли відповідними анти-видовими вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому, протягом 120 хв. за 37°C. Усі антитіла розводили у 5% розчині протеїнів молока або 3% розчині BSA у PBST. Після інкубації мембрани промивали PBST у режимі, зазначеному вище.

Імунореактивні зони візуалізували за допомогою методу підсиленої хемілюмінесценції (ECL), використовуючи 0,25 M розчин люмінолу у ДМСО, 0,09 M розчин кумарової кислоти у ДМСО, 0,1 M трис-HCl (pH 8,5) та 0,0035% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, авторадіографією на рентгенівських плівках [14]. В залежності від інтенсивності сигналу хемілюмінесценції час експозиції мембрани на плівці становив від 5 секунд до 10 хв. Для проявлення плівок їх обробляли комерційними розчинами проявнику та фіксажу. Після проявлення плівки сканували, напівкількісний аналіз отриманих

результатів проводили денситометрично, використовуючи програмне забезпечення TotalLab (TL120, Nonlinear Inc, США).

Молекулярну масу протеїнів у зразках визначали, порівнюючи їхню міграцію з розташуванням на нітроцелюлозній мембрані забарвлених маркерів Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, Литва, кат. № 26619) у діапазоні 10-230 кДа.

Приклад виявлення актину і GFAP наведено на рис. 2.7.

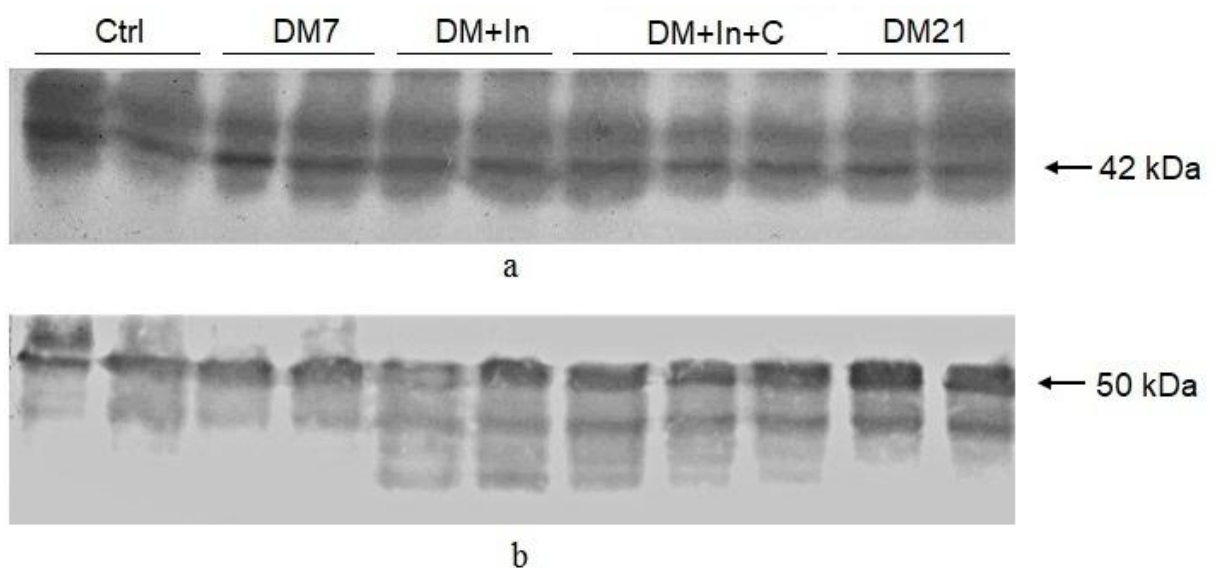


Рис. 2.7. Вміст актину і GFAP у тканині сітківки. Робочий імуноблот: Ctrl – контроль; DM7 – 7 діб після введення стрептозотоцину; DM-In – 21 доба та введення інсуліну; DM+In+C – 21 доба та комбіноване введення інсуліну і карбацетаму; DM21 – 21 доба, група контролю лікування.

На блотограмі чітко виявлялися смужки та ділянки зв'язування актину на рівні 42 kDa, що відповідало його молекулярній масі та підтверджувало правильність виконання методики. На блотограмах зв'язування GFAP на рівні 50 kDa відповідало молекулярній масі цього протеїну, чітко помітне збільшення кількості виявленого білка у пробах контролю лікування (DM21), та його зменшення у пробах з введенням

інсуліну і карбацетаму.

#### **2.4 Статистичні методи дослідження**

Для статистичної обробки отриманих даних використовували програму Statistica 10 (StatSoft, Inc., USA). Кожну статистичну вибірку оцінювали на предмет характеру розподілу даних – проводили тести Колмогорова-Смирнова та хі-квадрат ( $\chi^2$ ). Нормальність розподілу підтверджували при  $p > 0,05$ .

У вибірках розраховували середні та їх стандартні похибки. Вибіркові середні порівнювали із застосуванням дисперсійного аналізу (ANOVA), вірогідними вважали значення  $P < 0,05$ .



## РОЗДІЛ 3

### ОТРИМАНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 3.1 Характеристика нейродегенеративних процесів у сітківці при її діабетичному ураженні

Для загальної характеристики розвитку процесів нейродегенерації у сітківці в динаміці спостереження (7-28 доба після введення стрептозотоцину) були вивчені морфологічні ознаки пошкодження в контрольній групі (рис. 3.1).

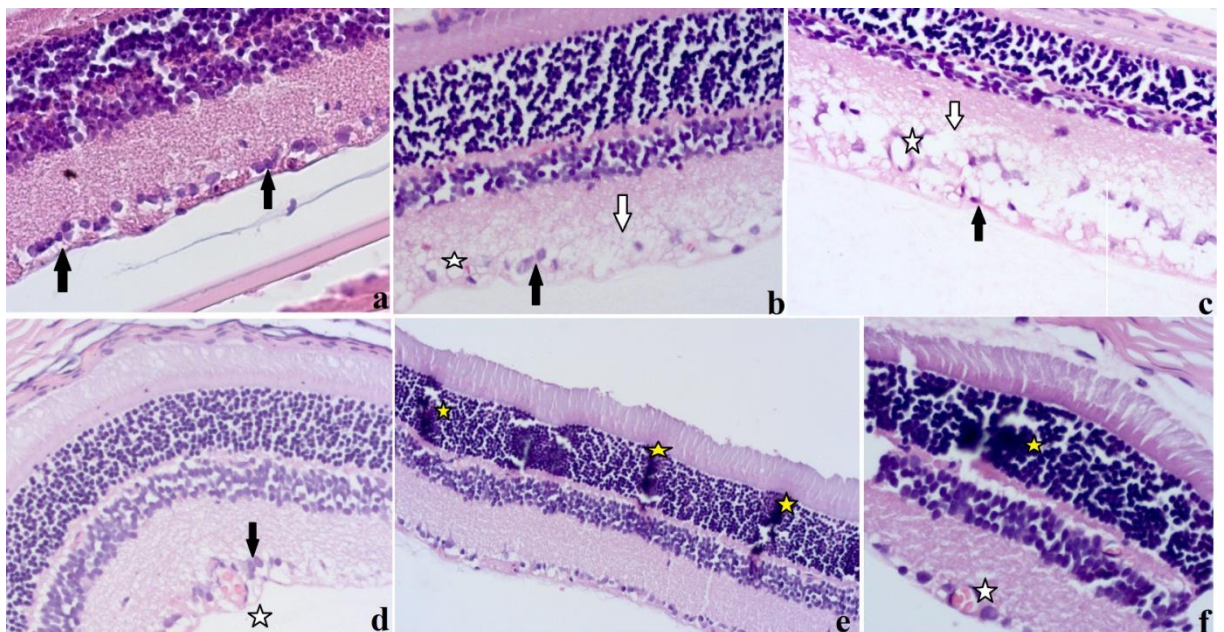


Рис. 3.1. Морфологічний стан сітківки контрольної групи:

а – інтактна тварина, до введення стрептозотоцину; в – через 7 діб; с – через 14 діб, d – через 21 добу, е і f – через 28 діб); забарвлення гематоксилін-еозин;  $\times 200$ .

Чорні стрілочки – гангліонарні клітини; білі стрілочки – ділянки ішемії у шарах сітківки; білі зірочки – мікроаневризми; жовті зірочки – клітинні проліферати.

Нормальна структура шарів сітківки інтактного щура до введення стрептозотоцину наведена на рис. 3.1 а. Через 7 діб спостерігався розвиток ранніх ознак ДР (див. рис. 3.1 б) з розрідженням ядерних шарів, зниженням щільності клітин та розрихленням нервових волокон. У всіх шарах виявлений набряк, що особливо було помітним у внутрішньому ядерному та плексиформному. Відмічено розширення судин з явищами тромбоутворення, численні ділянки ішемії, що супроводжувалося вакуолізацією цитоплазми нервових клітин, клітинним та навколоклітинним набряком, пікнозом ядер. Вже на цей термін спостерігалось суттєве зниження кількості гангліонарних клітин, їх набряк, розвиток у цьому шарі судинних аномалій з розширенням мікросудин та їх тромбуванням.

Такі зміни прогресували на 14-ту і 21-у добу (див. рис. 3.1 с і d). Наростали розрідження клітин у ядерних шарах, гіпохромія нейронів з вакуолізацією цитоплазми, екстрацелюлярний набряк, знижувалася щільність нервових волокон у плексиформних шарах. Гангліонарні клітини мали виражену вакуолізацію, а подекуди навпаки – гіперхромію цитоплазми, пікноз ядер.

Через 28 діб виявлялися специфічні прояви ДР: у внутрішніх шарах сітківки утворювалися численні мікроаневризми із значним розширенням просвіту судини, інколи – з утворенням декількох судинних просвітів, що були огорнуті щільною мембраною. У зовнішніх шарах сітківки відмічене формування клітинних проліфератів, що були утворені щільно розташованими базофільними округлими клітинами, які проростали за межі зовнішнього ядерного шару, інколи відшаровуючи його.

Такі зміни вказували на паралельний розвиток дегенеративних змін нервових клітин, судинних і проліферативних аномалій у сітківці вже на ранніх термінах розвитку ДР.

Лікування тварин інсуліном у 2-й групі супроводжувалося

гальмуванням розвитку як нейродегенеративних, так і діабетичних змін у сітківці (рис. 3.2 b) у порівнянні з нелікованими тваринами (рис. 3.2 a).

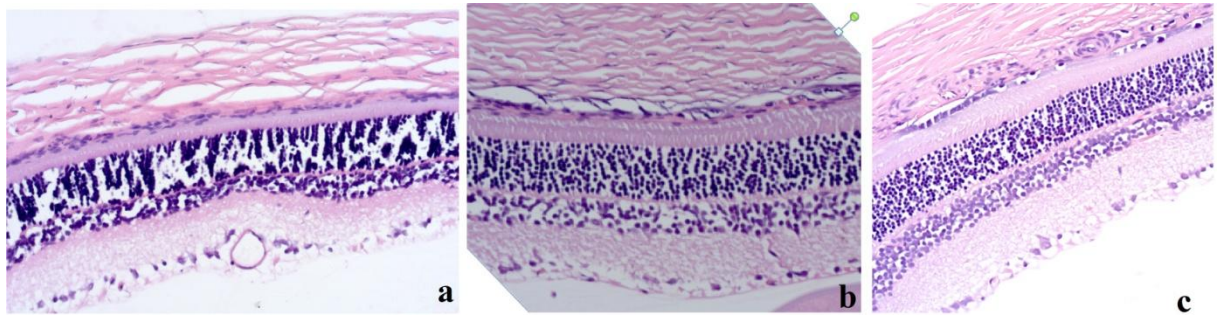


Рис. 3.2. Морфологічний стан сітківки щурів: а – контроль, в – введення інсуліну, с – введення інсуліну і карбацетаму; забарвлення гематоксилін-еозин;  $\times 200$ .

У порівнянні з контролем було менш виражене розрідження ядерних шарів, подекуди зберігалися ділянки набряку, ішемії, виявлялася ектазія венул, явища застою крові у внутрішніх ядерному та плексіформному шарах, зниження щільності гангліонарних клітин.

Введення інсуліну з карбацетамом попереджувало розвиток як нейродегенеративних, так і судинних проявів ДР (див. рис. 3.2 с). Щільність клітин та нервових волокон у сітківці фактично не відрізнялася від інтактних тварин. Можна було відмітити незначний набряк всіх шарів, повнокрів'я судин у зовнішньому плексіформному шарі, розрідження гангліонарних клітин. Ознаки ДР були мінімальні, а її специфічні прояви, такі як мікроаневризми й інші судинні аномалії та клітинні проліферати, були відсутні.

Клітинні зміни, що було відмічено під впливом введення інсуліну та карбацетаму, добре відображені на рис. 3.3. У порівнянні з контрольною групою (рис. 3.3 а) при лікуванні чітко візуалізувалися всі шари сітківки, щільність клітин ядерних шарів та нервових волокон була високою,

набряк, ішемія та інші прояви ДР були виражені у мінімальному ступені (рис. 3.3 b і c). Морфологічний стан сітківки при введенні інсуліну з карбацетамом загалом суттєво не відрізнявся від такого у інтактних щурів.

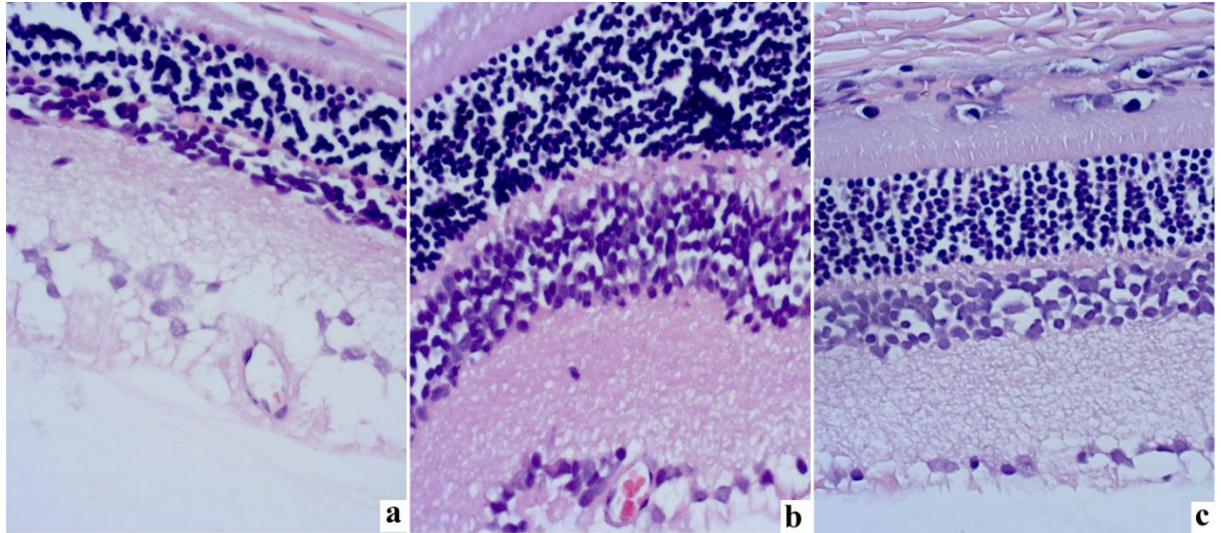


Рис. 3.3. Морфологічний стан сітківки щурів: а – контроль, в – введення інсуліну, с – введення інсуліну і карбацетаму; забарвлення гематоксилін-еозин;  $\times 400$ .

Таким чином, вже через тиждень після введення стрептозотоцину на тлі стабільної гіперглікемії розвивалися ранні прояви ДР, які включали специфічну картину нейродегенерації із зниженням щільності нервових клітин та розривленням нервових волокон. У подальшому ці зміни прогресували на тлі таких проявів ДР як набряк, повнокрів'я і дилатація судин, набряк з ділянками ішемії, а на пізніх термінах – утворення мікроаневризм (з 14-ї доби) та клітинних проліфератів (з 28-ї доби). Лікування інсуліном покращувало стан сітківки, а додавання до його введення карбацетаму попереджало розвиток діабетичного пошкодження сітківки.

### 3.2 Експресія нейроспецифічної енолази (NSE) у сітківці та вплив на неї агоністу бензодіазепінових рецепторів карбацетаму

Експресія NSE у шарах сітківки у контрольній групі характеризувалася як дифузним розповсюдженням NSE-позитивного забарвлення, так і певною клітинною локалізацією (рис. 3.4 А-С).

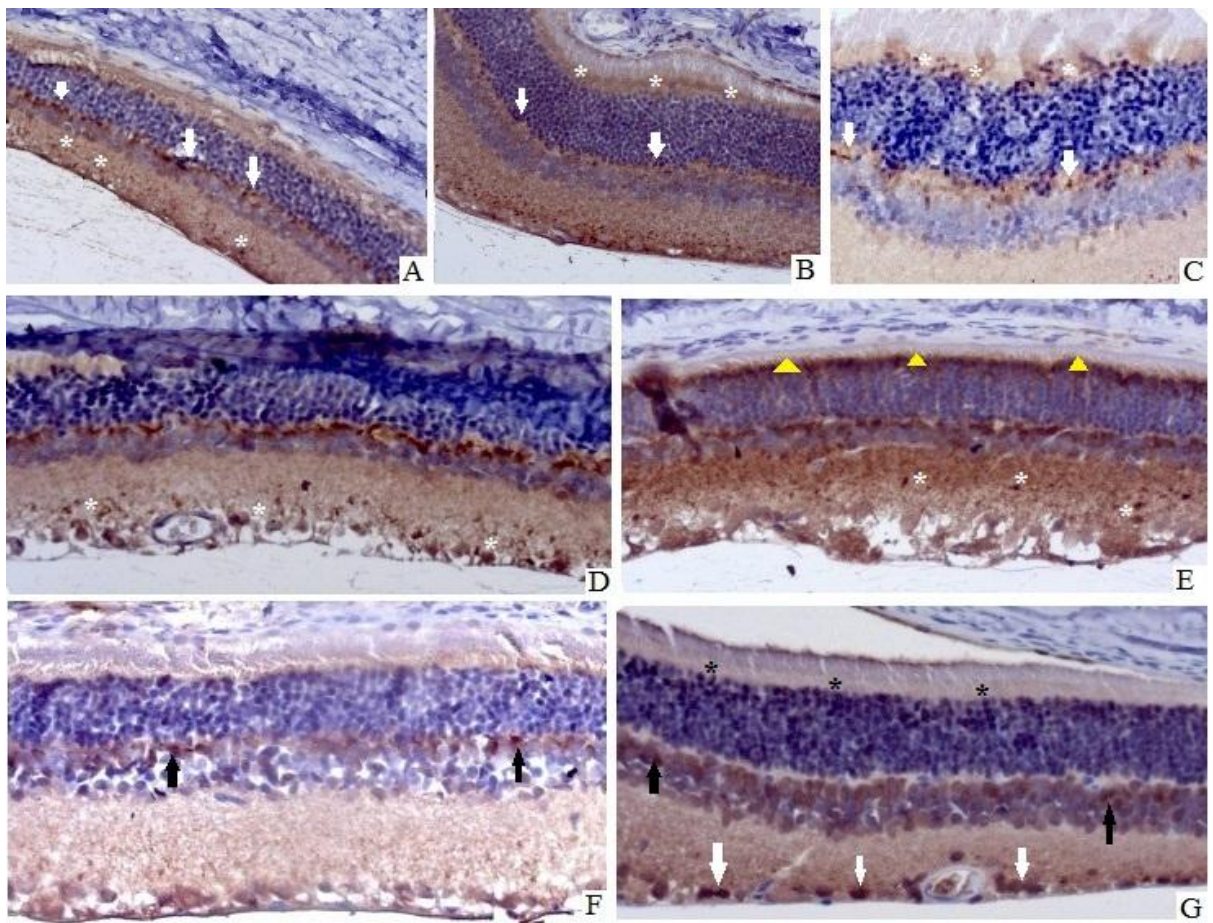


Рис. 3.4. Мікропрепарати сітківки шурів. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження NSE, дозабарвлення гематоксиліном;  $\times 200$ ;

А, В, С – контрольна група через 7 (А), 14 (В) і 28 (С) діб;

Д, Е – 14-а доба, введення інсуліну (Д) і карбацетаму (Е) діб;

Ф, Г – 28-а доба, введення інсуліну (Ф) і карбацетаму (Г) діб;

на А, В, С: білі стрілочки – NSE-позитивні клітини на межі зовнішніх ядерного і плексиформного шарів;

на А: білі зірочки – NSE-позитивні клітини внутрішнього плексиформного шару;

на В, С: білі зірочки – NSE-позитивне забарвлення внутрішнього сегменту фоторецепторів;

на D, E: білі зірочки – NSE-позитивні клітини внутрішніх шарів сітківки;

на E: жовті трикутники – NSE-позитивне забарвлення внутрішнього сегменту фоторецепторів;

на F, G: чорні стрілочки – NSE-позитивні клітини на межі зовнішніх ядерного і плексиформного шарів;

на G: білі стрілочки – NSE-позитивні гангліонарні клітини.

Через 7 діб у внутрішньому ядерному шарі забарвлювалися тіла дифузно розташованих відросткових клітин (див. білі зірочки на рис. 3.4 А), що за морфологією відповідали амакриновим [106]. Інтенсивність забарвлення цих клітин за шкалою D. Dabbs відповідала 2 балам. Крім того, у внутрішньому ядерному шарі з інтенсивністю до 1 балу спостерігалось фонове забарвлення, на тлі якого візуалізувалися численні нервові волокна, що у різних напрямках пересікали сітківку. Інтенсивність фонового забарвлення максимальною мірою виявлялася у контрольній групі на 14-у добу (див. рис. 3.4 В).

У зовнішньому ядерному шарі, переважно на його межі з зовнішнім плексиформним шаром спостерігався шар полігональних клітин з інтенсивністю забарвлення до 3 балів, які відповідали морфології горизонтальних клітин (див. білі стрілочки на рис. 3.4 А-С) [106].

Також досить інтенсивно, особливо на 14-у добу, забарвлювалися внутрішній сегмент фоторецепторів (див. білі зірочки на рис. 3.4 В, С).

Загальна інтенсивність NSE-позитивного забарвлення була менша на 28-у добу (до 2 балів) та локалізувалася переважно у клітинах зовнішнього плексиформного шару (див. білі стрілочки на рис. 3.4 C) та внутрішньому сегменті фоторецепторів (див. білі зірочки на рис. 3.4 C).

На 14-у добу в групах з введенням інсуліну та карбацетаму загальна інтенсивність NSE-специфічного забарвлення у різних шарах сітківки в порівнянні з відповідним контролем змінювалася різноспрямовано (див. рис. 3.4 D, E). У внутрішніх шарах сітківки виявлялися поодинокі гангліонарні та амакринові клітини (див. білі зірочки на рис. 3.4 D), знижувалася інтенсивність фонового забарвлення. При застосуванні інсуліну з карбацетамом забарвлення гангліонарних клітин було майже відсутнім (0-1 бал за шкалою D. Dabbs). Натомість у зовнішньому плексиформному шарі інтенсивність забарвлення клітин у порівнянні з контролем збільшувалася, особливо у групі із застосуванням інсуліну. У групі із застосуванням інсуліну з карбацетамом інтенсивно забарвлювався внутрішній сегмент фоторецепторів (жовті трикутники на рис. 3.4 E).

На 28-у добу в групах з введенням інсуліну та карбацетаму загальна інтенсивність NSE-специфічного забарвлення в порівнянні з попереднім терміном була суттєво зниженою (див. рис. 3.4 F, G). У зовнішньому плексиформному шарі виявлялися поодинокі NSE-позитивні клітини з інтенсивністю забарвлення до 1-2 балів (чорні стрілочки на рис. 3.4 F, G). При застосуванні інсуліну з карбацетамом збільшувалася кількість інтенсивно забарвлених гангліонарних клітин, вони чітко візуалізувалися (див. білі стрілочки на рис. 3.4 G). Натомість у зовнішньому плексиформному шарі інтенсивність забарвлення клітин зменшувалася і не перевищувала 1 балу (див. чорні стрілочки на рис. 3.4 G). Також фактично зникло NSE-позитивне забарвлення внутрішнього сегменту фоторецепторів (див. чорні зірочки на рис. 3.4 E).

Для порівняння груп дослідження на рис. 3.5 наведена інтенсивність

забарвлення клітин зовнішнього плексиформного шару.

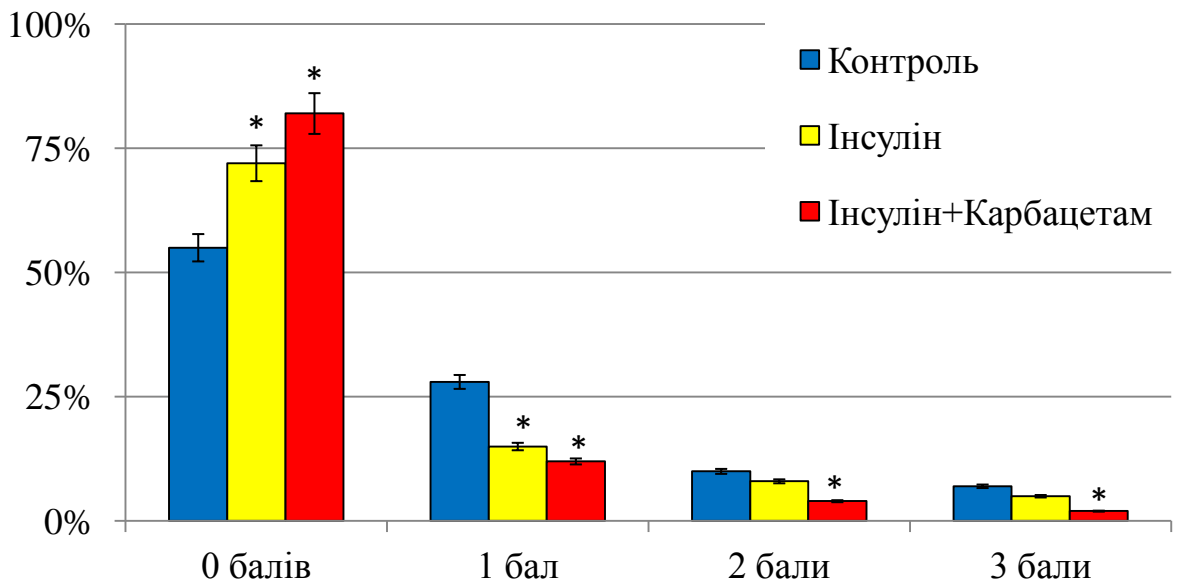


Рис. 3.5. Гістограма розподілу кількості NSE-позитивних клітин (%) зовнішнього плексиформного шару залежно від інтенсивності імуноспецифічного фарбування за шкалою D. Dabbs [36] у групах тварин на 28 добу; \* –  $P < 0,05$  порівняно з контролем

При застосуванні інсуліну і, більшою мірою, інсуліну з карбацетамом збільшувалася кількість незабарвлених клітин, тоді як кількість забарвлених (1-3 бали) – зменшувалася ( $P < 0,05$  для групи з комбінованим введенням інсуліну і карбацетаму в порівнянні з контролем).

Цитологічні зміни у контрольній групі характеризувалися слабкою інтенсивністю забарвлення (до 1-2 балів) гангліонарних та амакринових клітин внутрішніх шарів сітківки, зовнішнього плексиформного шару та внутрішнього сегменту фоторецепторів (рис. 3.6 А). Відмічено, що NSE-позитивні клітини (див. білі зірочки на рис.3.6 А) групувалися навколо мікроаневризм, які на цей термін утворювалися по внутрішній поверхні



сітківки (див. біла стрілка на рис. 3.6 А). У зовнішньому ядерному шарі утворювалися численні клітинні проліферати (див. чорні стрілочки на рис. 3.6 А).

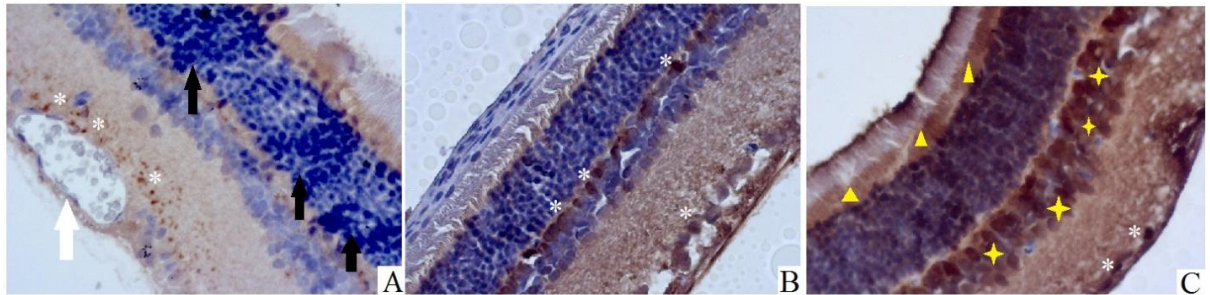


Рис. 3.6. Мікропрепарати сітківки щурів. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження NSE через 28 діб спостереження, дозабарвлення гематоксиліном;  $\times 400$ ; А – контроль; В – введення інсуліну; С – введення інсуліну і карбацетаму.

на А: біла стрілка – мікроаневризма; білі зірочки – NSE-позитивні клітини у внутрішньому плексиформному шарі; чорні стрілочки – клітинні проліферати у зовнішніх шарах сітківки;

на В: білі зірочки – NSE-позитивні клітини;

на С: білі зірочки – NSE-позитивні гангліонарні клітини; жовті зірочки – NSE-позитивні клітини у внутрішньому ядерному шарі; жовті трикутники – NSE-позитивне забарвлення внутрішнього сегменту фоторецепторів.

Застосування інсуліну сприяло зберіганню NSE-позитивно забарвлених клітин у шарах сітківки (див. білі зірочки на рис. 3.6 В) при зменшенні інтенсивності фонового забарвлення. Застосування інсуліну з карбацетамом посилювало цю тенденцію: NSE-позитивне забарвлення виявлялося у гангліонарних клітинах (див. білі зірочки на рис. 3.6 С), клітинах внутрішнього ядерного шару (див. жовті зірочки на рис. 3.6 С) та внутрішньому сегменті фоторецепторів. (див. жовті трикутники на рис.

3.6 С). При цьому утворення мікроаневризм та клітинних проліфератів не спостерігалось.

Таким чином, NSE-позитивне забарвлення мали гангліонарні клітини, нейрони внутрішнього та зовнішнього ядерних шарів та внутрішній сегмент фоторецепторів. Розвиток ДР супроводжувався збільшенням інтенсивності забарвлення до 14-ї доби, після чого воно було на досить низькому рівні. Застосування інсуліну і, більшою мірою, інсуліну з карбацетамом сприяло зберіганню NSE-позитивних нервових клітин, зменшенню фонового забарвлення та запобігало розвитку таких морфологічних ознак ДР як мікроаневризми у внутрішніх шарах та клітинні проліферати у зовнішніх шарах сітківки.

### **3.3 Експресія нейрофіламентів у сітківці та вплив агоністу бензодіазепінових рецепторів карбацетама**

У сітківці щурів на початку експерименту (до моделювання ЦД) NF-H-позитивне забарвлення було виявлено у шарі нервових волокон сітківки у вигляді повздожних волокон різної протяжності та у аксональних пагорбах гангліонарних нейронів (рис. 3.7). Інтенсивність їх забарвлення за шкалою D. Dabbs відповідала 3 балам.

У внутрішньому плексиформному шарі імунопозитивні волокна мали невелику протяжність, малий діаметр та хаотичний хід, але частіше розподілялися повздожньо. Морфологія їх відповідала аксонам горизонтальних клітин [159], а інтенсивність забарвлення не перевищувала 2 балів. У зовнішньому плексиформному шарі відмічені численні NF-H-позитивні нервові волокна, які були інтенсивно забарвлені (до 3 балів) та утворювали щільне сплетіння вздовж всього шару. За морфологією вони відповідали аксонам амакринових клітин [159]. Ядерні шари сітківки

чіткого NF-H-позитивного забарвлення не проявляли.

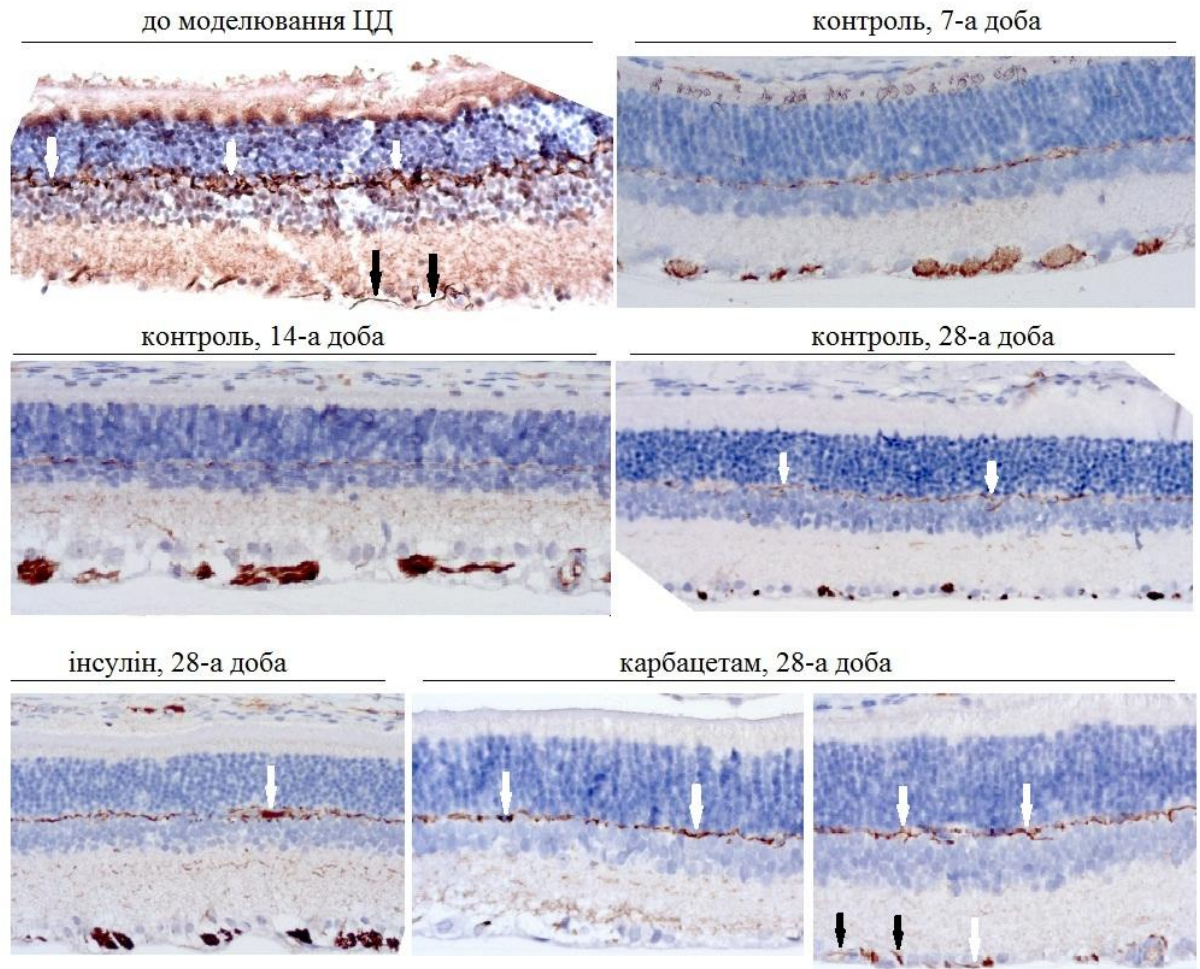


Рис. 3.7. Мікропрепарати сітківки щурів. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження нейрофіламентів (NF-H), дозбарвлення гематоксиліном;  $\times 200$ ;

Примітки:

до моделювання ЦД: чорні стрілочки – повздовжні імунопозитивні волокна у шарі нервових волокон; білі стрілочки – сплетіння імунопозитивних волокон у зовнішньому плексиформному шарі;

контроль 28-а доба: білі стрілочки – слабе забарвлення волокон у внутрішньому плексиформному шарі;

інсулін, 28-а доба; карбацетам, 28-а доба: білі стрілочки – інтенсивне забарвлення волокон у внутрішньому плексиформному шарі; чорні стрілочки – імунопозитивні волокна у шарі нервових волокон.

У динаміці розвитку ДР на 7-му, 14-ту та 28-му добу у плексиформних шарах сітківки спостерігалось значне зниження інтенсивності імуноспецифічного забарвлення, яке не перевищувало 1 балу за шкалою D. Dabbs. У шарі нервових волокон інтенсивність забарвлення дещо збільшувалася, але воно концентрувалось переважно навколо розширених мікросудин, які мали тенденцію до утворення мікроаневризмів (див. рис. 3.7). Ці зміни максимальною мірою були виражені на 28-му добу. На цей термін у внутрішньому плексиформному шарі було відмічено зникнення NF-H-позитивного забарвлення.

Введення інсуліну сприяло менш вираженому зниженню інтенсивності імуноспецифічного забарвлення у зовнішньому плексиформному шарі (див. рис. 3.7), що було підтверджено при оцінці інтенсивності забарвлення NF-H-позитивних нервових волокон (рис. 3.8).

При введенні карбацетаму імуноспецифічні волокна зовнішнього плексиформного шару мали високу інтенсивність забарвлення, більш чітку структуру нервових сплетінь, волокна яких подекуди продовжувалися у внутрішній ядерний шар (див. рис. 3.7). Також простежувалися аксони та аксональні пагорби у гангліонарних клітинах шару нервових волокон. Інтенсивність забарвлення плексиформних шарів була суттєво збільшена у порівнянні з контролем та групою з введенням інсуліну ( $P < 0,05$ ; див. рис. 3.8).

Таким чином, характерна для норми висока інтенсивність NF-H-позитивного забарвлення аксонів плексиформних шарів та шару нервових волокон в процесі розвитку ДР суттєво знижувалася, що могло бути морфологічним відображенням процесів нейродегенерації.

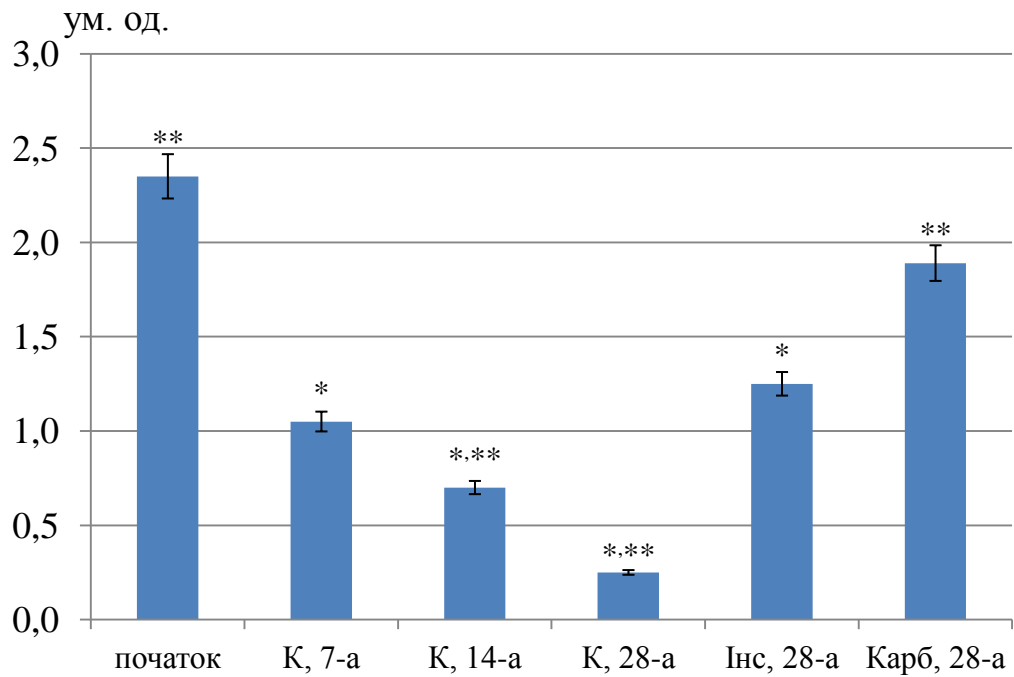


Рис. 3.8. Інтенсивність NF-H-позитивного забарвлення аксонів зовнішнього плексиформного шару за шкалою D. Dabbs; за віссю ординат – інтенсивність забарвлення (ум.од.), за віссю абсцис – групи тварин: початок – до моделювання ЦД; К – контрольна група; Інс – введення інсуліну, Карб – введення карбацетаму; 7-а, 14-а, 28-а – доба спостереження;

\* –  $P < 0,05$  у порівнянні з контрольною групою;

\*\* –  $P < 0,05$  у порівнянні з групою з введенням інсуліну.

Введення інсуліну в комбінації з карбацетамом запобігало діабетичному зниженню експресії мікрофіламентів в сітківці.

### **3.4 Експресія гліального кислого фібрилярного протеїну (GFAP) і каспази-3 у сітківці та вплив агоністу бензодіазепінових рецепторів карбацетаму**

Розподіл GFAP-позитивного забарвлення сітківки на різних термінах дослідження представлено на рис. 3.9. На 7-у добу окремі імунопозитивні клітини, ймовірно астроцити, та їх відростки виявлялися тільки у шарах гангліонарних клітин та нервових волокон (рис. 3.9 а,б).

На 14-ту добу (див. рис. 3.9 в) інтенсивність специфічного забарвлення у цих шарах збільшувалася – фактично на всій протяжності шару нервових волокон спостерігалася щільна смужка повздовжніх коричневих волокон.

Крім того, визначалися чіткі GFAP-позитивні радіальні волокна, які через внутрішній плексиформний шар прямували до внутрішнього ядерного шару, де були помітні численні GFAP-позитивні відросткові клітини.

Ймовірно, ця картина відображала залучення клітин Мюллера, які, на відміну від астроцитів, у нормі слабо експресують GFAP, але активуються при ЦД [78].

При використанні інсуліну (див. рис. 3.9 г) відмічено слабкішу інтенсивність забарвлення GFAP-позитивних клітин та волокон, що могло відповідати меншому ступеню метаболічних порушень у тварин цієї групи.

Також і використання разом з інсуліном карбацетаму супроводжувалося слабшою порівняно з контрольною групою інтенсивністю GFAP-позитивного забарвлення (див. рис. 3.9 д).

Окремо слід зазначити, що з 14-ї доби у сітківці виявлялися мікроаневризми та вогнища ангіогенезу (чорна стрілка на рис. 3.9 г), які мали значно розширені судини з проліферацією ендотелію.

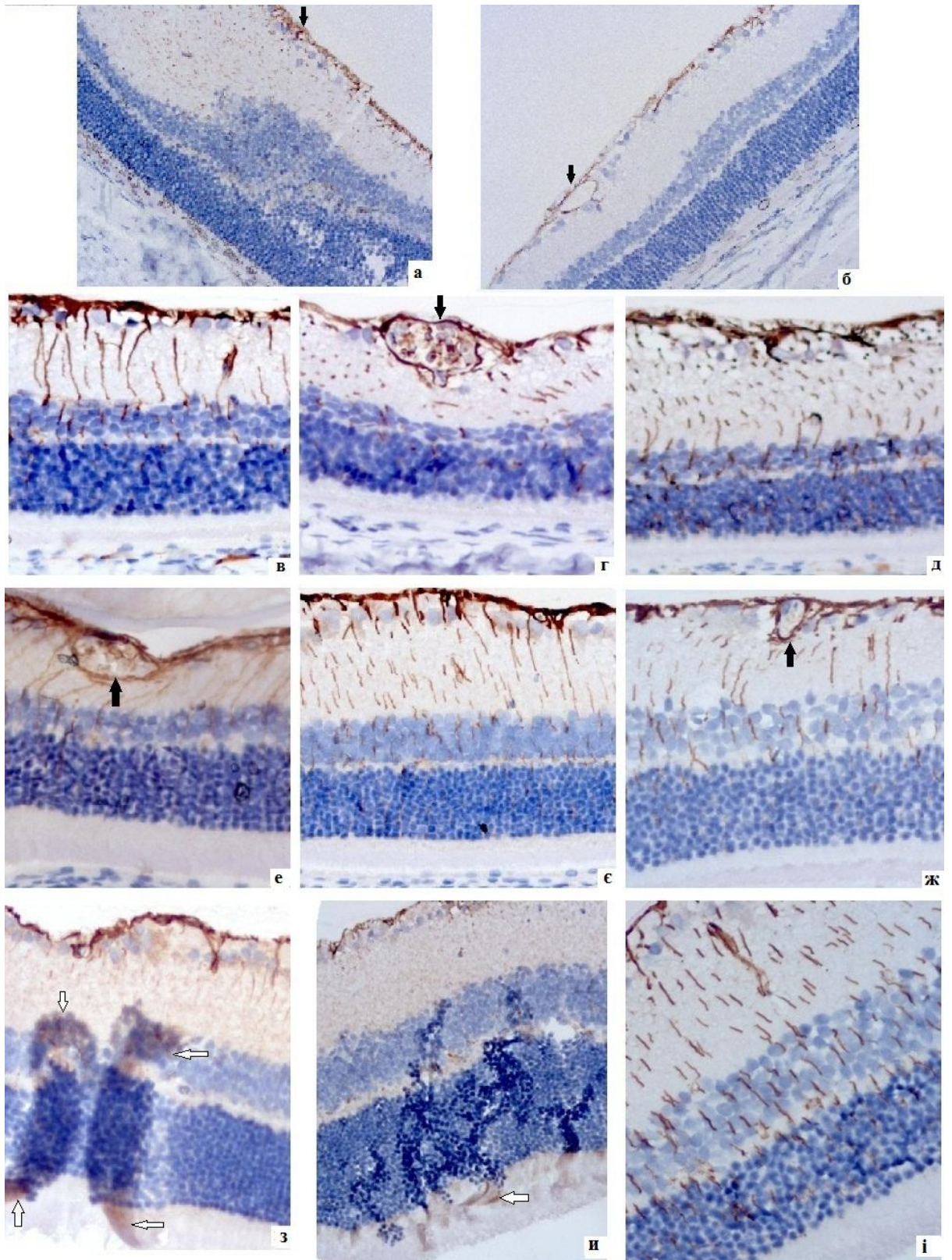


Рис. 3.9. Мікропрепарати сітківки щура. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження GFAP, дозabarвлення гематоксилином; а, б – збільшення у 200 раз; в-і – у 400 разів;

а, б – контрольна група, 7 діб; в, г, д – 14-та доба;

е, є, ж – 21-ша доба; з, и, і – 28-ма доба;

в, е, з – контрольна група, г, є, и – введення інсуліну, д, ж, і – введення інсуліну і карбацетаму;

Примітки: чорні стрілки на а, б – імунопозитивне забарвлення у шарі нервових волокон; чорні стрілки на г, е, ж – мікроаневризми сітківки; білі стрілки на з, и – імунопозитивні волокна у вогнищах клітинної проліферації

Інколи, вони утворювали декілька мікросудинних просвітів, щільно розташованих один до одного і огорнутих товстою периваскулярною мембраною, що відповідало першим клінічним проявам НПДР (мікроаневризми та невеликі точкові кровотечі) [103]. З цими судинами щільно контактували GFAP-позитивні відростки.

Через 21 день у контрольній групі експресія GFAP наростала зі збільшенням щільності радіальних волокон, які продовжувалися у зовнішні шари сітківки (див. рис. 3.9 е). Застосування інсуліну окремо та у комбінації з карбацетамом зменшувало інтенсивність GFAP-позитивного забарвлення (див. рис. 3.9 є,ж).

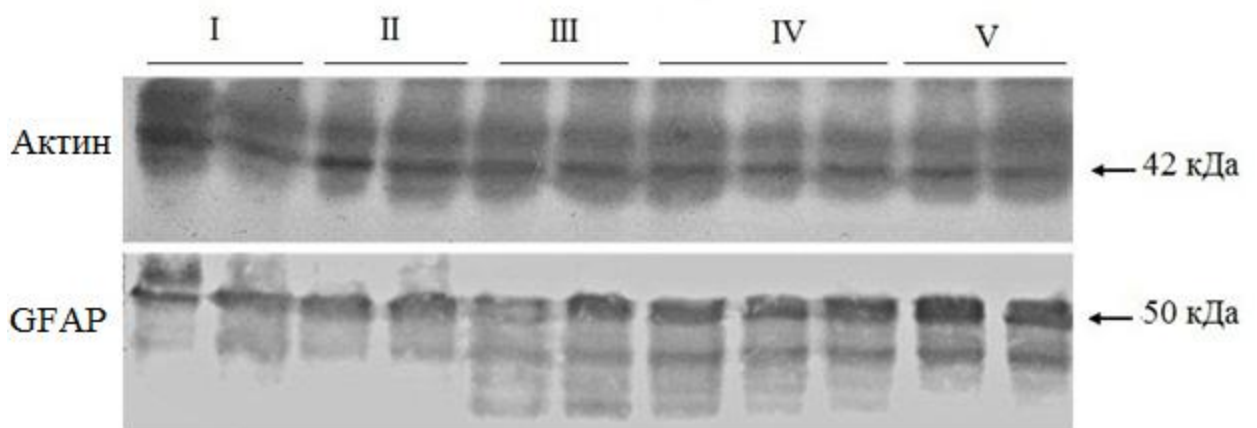
Дуже цікаве явище було виявлено на 28-й день у зовнішніх шарах сітківки в контрольній групі (див. рис. 3.9 з). Ще на попередніх термінах у зовнішньому ядерному шарі з'являлися інтенсивно базофільні округлі клітини, які формували окремі групи. Через 28 діб клітини утворювали чіткі проліферати, які проростали за межі цього шару. В середині цих проліфератів концентрувалися GFAP-позитивні волокна (білі стрілки на рис. 3.9 з), що ймовірно було відображенням гліально-мезенхімального переходу клітин Мюллера, який є основним фіброгенним механізмом при ПДР [172]. Під дією трофобластичного фактора росту (TGF- $\beta$ ) на тлі надекспресії васкулоендотеліального фактора росту (VEGF) відбувається



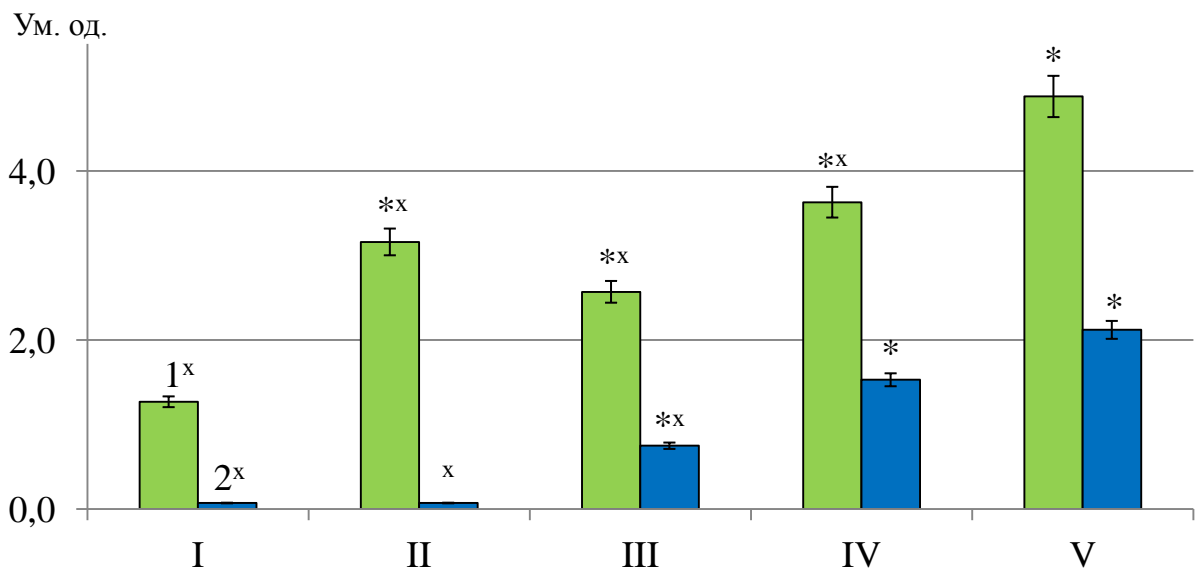
трансдиференціація гліальних клітин Мюллера у міофібробласти.

Дія інсуліну знижувала як інтенсивність GFAP-позитивного забарвлення сітківки, так і розвиток вогнищ ангиогенезу та клітинних проліфератів сітківки, що було притаманне також і сумісній дії інсуліну з карбацетамом (див. рис. 3.9 и, і).

Результати імуногістохімічного дослідження були кількісно підтверджені імуноблотингом (рис. 3.10).



а



б

Рис. 3.10. Вміст GFAP (1) і продуктів його фрагментації (2) у тканині сітківки у контрольній групі на початку дослідження (I), через 7 і 28 діб (II і V відповідно), а також через 28 діб при введенні інсуліну (III) та інсуліну

з карбацетамом (IV);

а – репрезентативні блотограми актину і GFAP;

б – результати денситометричного аналізу блотограм GFAP і продуктів його фрагментації (співвідношення до вмісту актину, ум од.);

\*  $P < 0,05$  порівняно зі значенням на початку дослідження;

<sup>x</sup>  $P < 0,05$  порівняно з контролем на 28-му добу

Вміст GFAP у тканині сітківки контрольної групи суттєво зростав на 7-му і 28-му добу (в 2,5 та в 3,8 раза, відповідно, порівняно з початковим рівнем;  $P < 0,05$ ), тоді як при застосуванні інсуліну його приріст на 28-у добу був значно менший (перевищував контрольні значення в 1,9 раза;  $P < 0,05$ ). Застосування інсуліну з карбацетамом також супроводжувалося меншим приростом вмісту GFAP, але він був дещо вищим від такого при застосуванні інсуліну (див. рис. 3.10 б).

Як видно з рис. 3.10 а, на блотограмах проб, що були взяті через 28 діб, крім характерної для протеїну GFAP смужки з масою 50 кДа виявлялася додаткова смужка з меншою молекулярною масою (<50 кДа), яка відповідала продуктам його фрагментації. Це висвітлювало особливість метаболізму GFAP при ДР у щурів та додатково підтверджувало більшу активацію гліальних елементів сітківки.

Тісний зв'язок надекспресії GFAP і апоптозу глії за умов розвитку ДР [6] став обґрунтуванням імуногістохімічного дослідження ефекторного проапоптотичного ензиму каспази-3 у сітківці.

Порівнюючи результати виявлення GFAP і каспази-3 (рис. 3.11) можна було чітко визначити активацію апоптозу у тих самих відростатих клітинах шару гангліонарних клітин (чорні стрілочки на рис. 3.11 б) та у радіальних волокнах внутрішнього плексиформного шару (відростки мюллерових клітин).

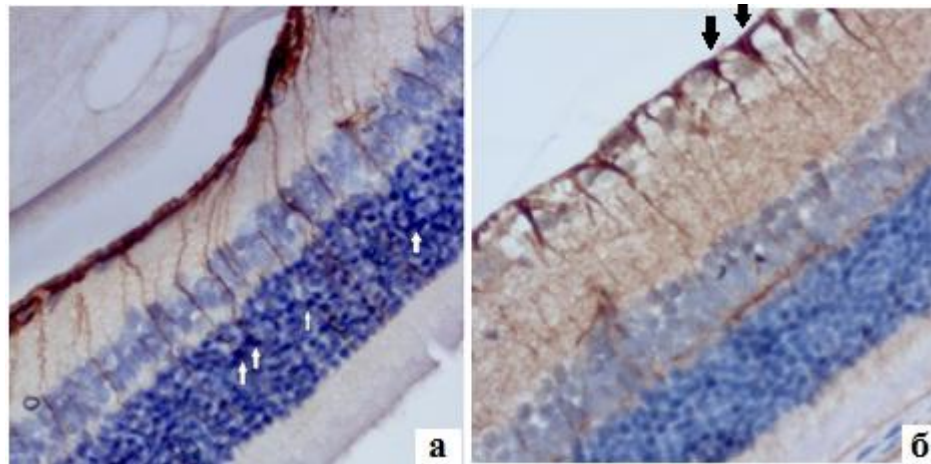


Рис. 3.11. Мікропрепарати сітківки щура; контрольна група, 21-ша доба. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження GFAP (а) та каспази-3 (б), дозабарвлення гематоксиліном; збільшення у 400 разів.

Примітки: білі стрілки на а – скупчення округлих базофільних клітин у зовнішньому ядерному шарі (початок клітинної проліферації); чорні стрілки на б – апоптотичні клітини та їх відростки у шарі гангліонарних клітин.

Крім того, було порівняно експресію каспази-3 у сітківці у групах тварин (рис. 3.12). В контрольній групі інтенсивне імуноспецифічне забарвлення виявлялося у стінці судин (ендотелії) внутрішніх шарів сітківки, що утворювали численні мікроаневризми з ознаками ангіогенезу (чорні стрілки на рис. 3.12 а). У ендотелії капілярів таких судин виявлялося інтенсивне імунопозитивне забарвлення, що свідчило про активацію апоптозу цих клітин. Також позитивними були клітини і радіальні волокна у внутрішньому плексиформному шарі, відображаючи активність апоптозу у астроцитах та їх відростках. У зовнішніх шарах сітківки утворювалися проліферати, клітини яких також мали імуноспецифічне забарвлення (білі стрілки на рис. 3.12 а). Отже, процеси апоптозу супроводжували розвиток патологічних проявів у сітківці при ДР.

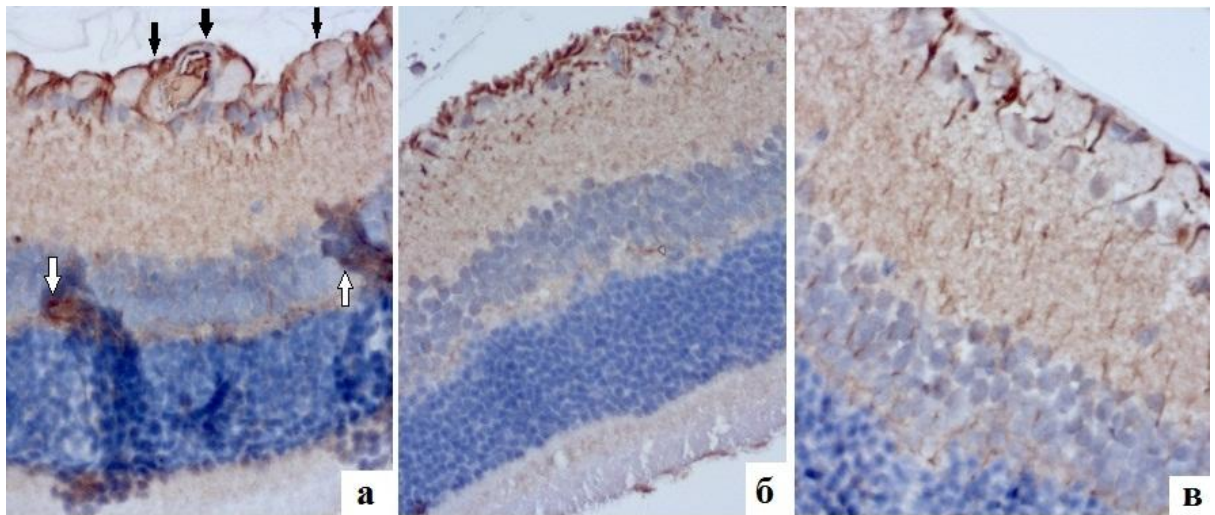


Рис. 3.12. Мікропрепарати сітківки щура. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження каспази-3 на 28-у добу, дозabarвлення гематоксиліном; а – контрольна група, б – введення інсуліну, в – введення інсуліну і карбацетаму; x400.

Примітки: чорні стрілки – мікроаневризми сітківки з вогнищами ангиогенезу, імунопозитивне забарвлення ендотелію; білі стрілки – імунопозитивні клітини у складі клітинних проліфератів

Вплив інсуліну та карбацетаму попереджував розвиток проявів ДР, інтенсивність імуноспецифічного забарвлення каспази-3 була меншою, вона виявлялася тільки у внутрішніх шарах сітківки (див. рис. 3.12 б,в).

Таким чином, нами було встановлено, що при розвитку ДР експресія гліального маркера GFAP прогресивно збільшувалася. GFAP-позитивні клітини та волокна виявлялися на 7-му добу у шарі нервових волокон, з 14-ї доби – у вигляді радіальних волокон у внутрішніх шарах сітківки (відростки та тіла клітин Мюллера), а на 28-му добу – у складі клітинних проліфератів сітківки. Застосування інсуліну та карбацетаму зменшувало експресію GFAP. Тканинна експресія проапоптотичного протеїну каспази-3 відповідала такій для GFAP; дія інсуліну і карбацетаму знижувала експресію каспази-3.

### 3.5 Експресія білка S100 у сітківці та вплив агоністу бензодіазепінових рецепторів карбацетаму

Морфологічна картина інтактної сітківки відрізнялася чітким розділенням шарів та імуноспецифічним забарвленням S100-позитивних клітин та їх відростків з інтенсивністю за шкалою D. Dabbs 2-3 бали (рис. 3.13; рис. 3.14 a, b).

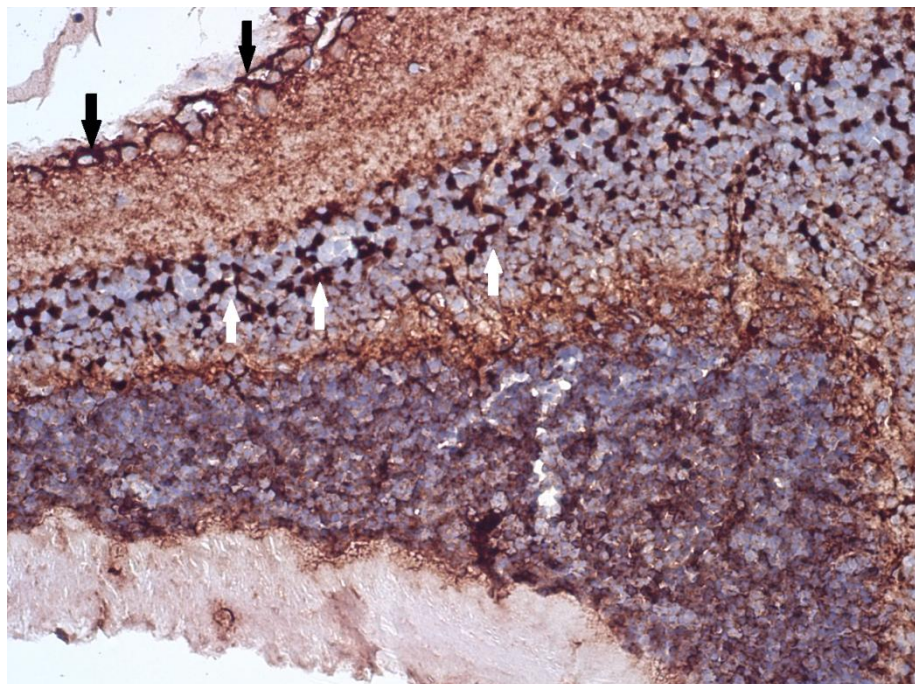


Рис. 3.13. Мікропрепарат сітківки щура до моделювання ЦД. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження білка S100, дозабарвлення гематоксиліном;  $\times 400$ .

Примітки: чорні стрілки – імунопозитивне забарвлення гліальних волокон у шарі гангліонарних клітин; білі стрілки – поліморфні численні S100-позитивні клітини внутрішнього ядерного шару.

Найбільш інтенсивно були забарвлені поліморфні клітини внутрішнього ядерного шару (білі стрілки на рис. 3.13), які відповідали

морфології клітин Мюллера, а також амакринових, біполярних та горизонтальних нейронів [23].

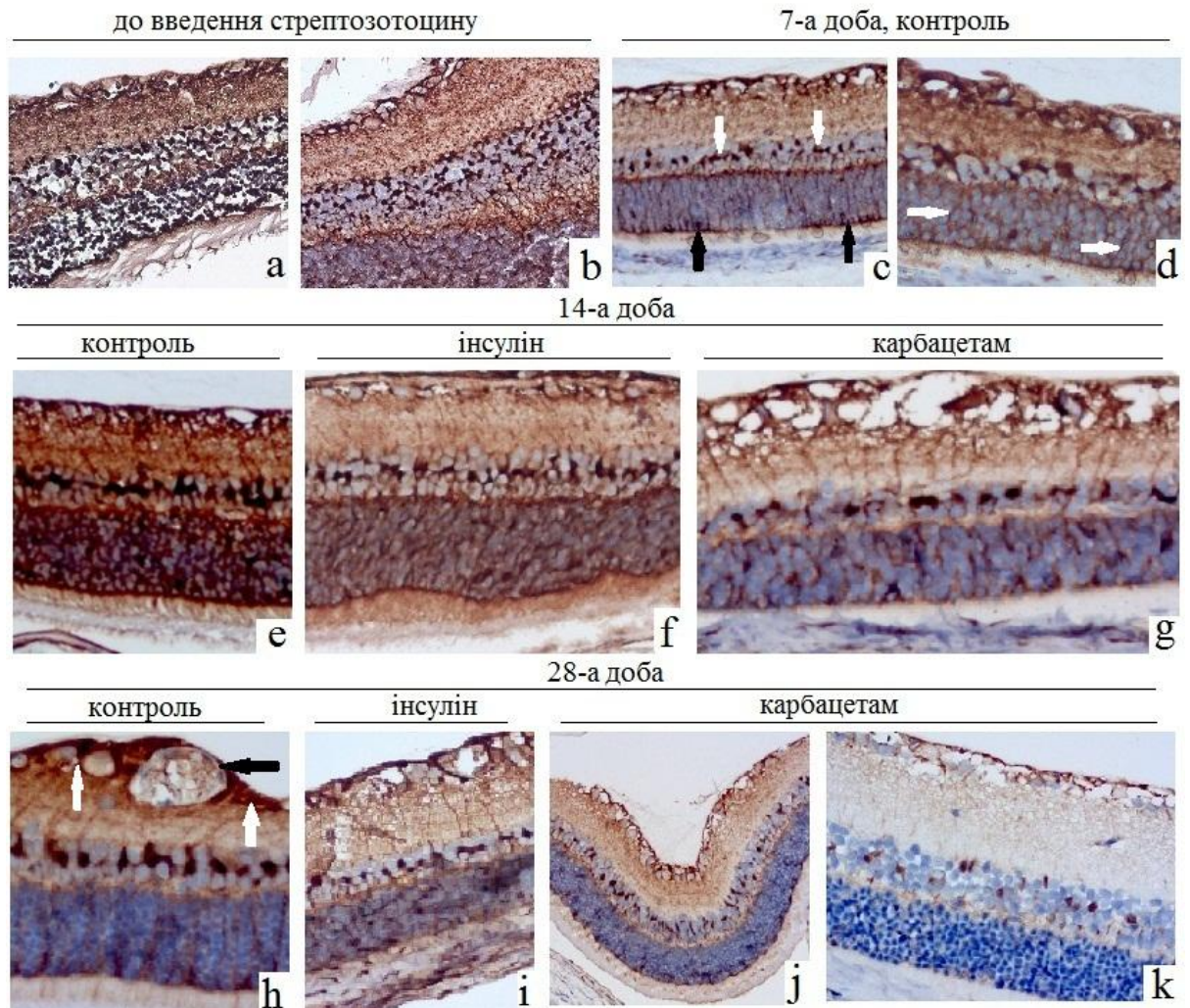


Рис. 3.14. Мікропрепарати сітківки щурів. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження білка S100, дозобарвлення гематоксиліном;

а, с, j –  $\times 200$ ; решта –  $\times 400$ ;

а, b – до моделювання ЦД; с, d – 7-а доба;

е, f, g – 14-а доба; h, i, j, k – 28-а доба.

Примітки: білі стрілочки на с – S100-позитивні клітини внутрішнього ядерного шару; чорні стрілочки на с – S100-позитивно

забарвлені частини клітин пігментного епітелію, що подовжувалися у зовнішній ядерний шар; білі стрілочки на d – радіальні гліальні волокна у зовнішніх шарах сітківки; чорна стрілочка на h – мікроаневризми на внутрішній поверхні сітківки; білі стрілочки на h – сплетіння S100-позитивних гліальних волокон навколо аневризми.

Їх відростки були позитивно забарвлені тільки поблизу клітин, але не на їх протязі. Також інтенсивно забарвлювалися гліальні елементи навколо тіл крупних гангліонарних нейронів (чорні стрілки на рис. 3.13), які муфтоподібно охоплювали тіла цих нейронів.

На 7-му добу інтенсивне позитивне забарвлення лишилося тільки у клітинах, що розташовувалися у внутрішньому ядерному шарі, переважно посередині (білі стрілки на рис. 3.14 c). За морфологією їх можна було віднести до клітин Мюллера.

Також у вигляді облямівки позитивно забарвлювалися частини клітин пігментного епітелію, що подовжувалися у зовнішній ядерний шар (чорні стрілки на рис. 3.14 c). Інтенсивно забарвлювалися відростки клітин Мюллера, що радіально пересікали зовнішній ядерний шар (білі стрілки на рис. 3.14 d).

На 14-ту добу у контролі інтенсивність забарвлення була максимальною (до 4 балів за шкалою D. Dabbs; рис. 3.14 e). Інтенсивне забарвлення відмічено у зовнішньому ядерному шарі та на його межі з шаром паличок і колобочок, а також – у шарі гангліонарних клітин. Загальне послаблення інтенсивності забарвлення на цій термін було характерно для дії інсуліну та карбацетами (рис. 3.14 f, g).

Забарвлення до 2 балів відмічено у клітинах Мюллера, волокнах та поодиноких полігональних відросткових клітинах зовнішніх шарів сітківки.

На 28-у добу в контролі з'являлися вогнища патологічного

ангіогенезу – мікроаневризми (чорна стрілка на рис. 3.14 h), які мали значно розширені судини, інколи з декількома просвітами, щільно розташованими один до одного і огорнутих товстою периваскулярною мембраною, що відповідало раннім проявам непроліферативної ДР (мікроаневризми та невеликі точкові кровотечі) [23].

З мікроаневризмами щільно контактували інтенсивно забарвлені S100-позитивні відростки (білі стрілки на рис. 3.14 h).

Менш виражене забарвлення спостерігалось при дії інсуліну (рис. 3.14 i), морфологічна картина в цілому відповідала такій на попередньому терміні – інтенсивно забарвлювалися крупні відросткові клітини внутрішнього ядерного шару, радіальні відростки внутрішнього плексиформного шару та поодинокі клітини і переплетені волокна зовнішнього ядерного шару.

Найменша ступінь забарвлення була притаманна дії карбацетаму (рис. 3.14 j, k). Забарвлення до 2 балів спостерігалось у поодиноких клітинах Мюллера внутрішнього ядерного шару та сплетінні волокон астроцитів шару гангліонарних волокон.

Також для цієї групи була характерна відсутність аневризм внутрішніх шарів сітківки.

Підрахування долі клітин у внутрішньому ядерному шарі з різною інтенсивністю імунопозитивного забарвлення за шкалою D. Dabbs на 28-му добу підтвердило отримані результати (рис. 3.15).

У контрольній групі переважна кількість клітин (85%) мала інтенсивне забарвлення (2-3 бали).

При введенні інсуліну переважали клітини зі слабкою інтенсивністю забарвлення (1-2 бали; 66%).

Дія карбацетаму супроводжувалася наростанням долі клітин зі слабким забарвленням (0-1 бал; 57%;  $P < 0,05$ ).



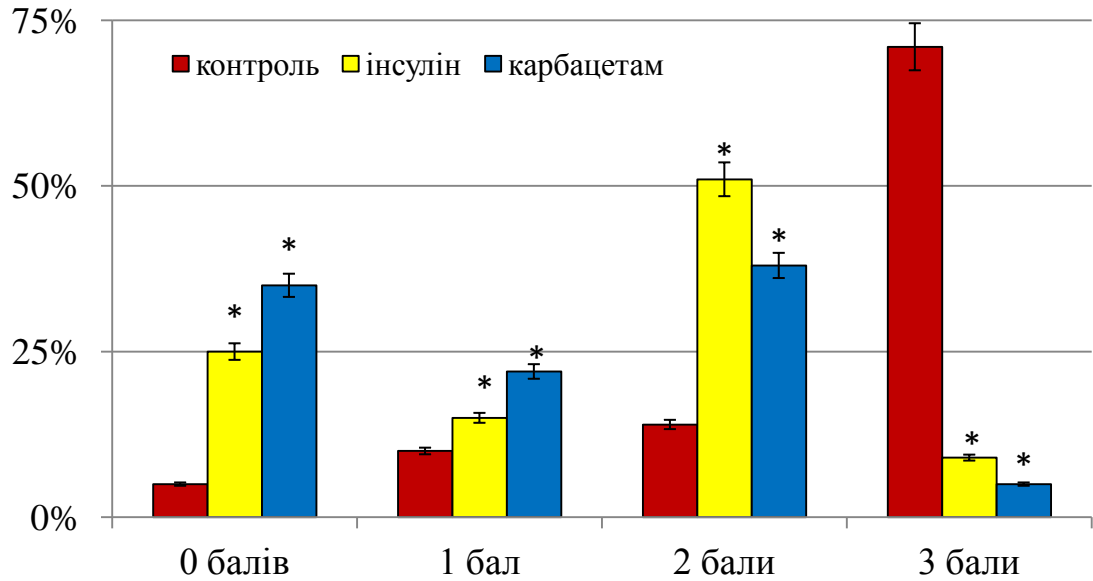


Рис. 3.15. Гістограма розподілу кількості S100-позитивних клітин (%) у внутрішньому ядерному шарі в залежності від інтенсивності імуноспецифічного забарвлення за шкалою D. Dabbs у групах тварин на 28-му добу;

\* –  $P < 0,05$  у порівнянні з контролем.

Таким чином, розвиток ранньої ДР характеризувався наростанням інтенсивності S100-позитивного забарвлення клітин Мюллера у внутрішньому ядерному шарі, волокон астроцитів у гангліонарному шарі, радіальних волокон у зовнішніх шарах сітківки та пігментного епітелію. Застосування інсуліну ці прояви зменшувало, а застосування разом з інсуліном карбацетаму – попереджувало активацію S100-позитивної глії сітківки.

### **3.6 Експресія васкулоендотеліального фактора росту (VEGF) і гіпоксіяіндуцибельного фактору (HIF-1 $\alpha$ ) у сітківці та вплив агоністу бензодіазепінових рецепторів карбацетаму**

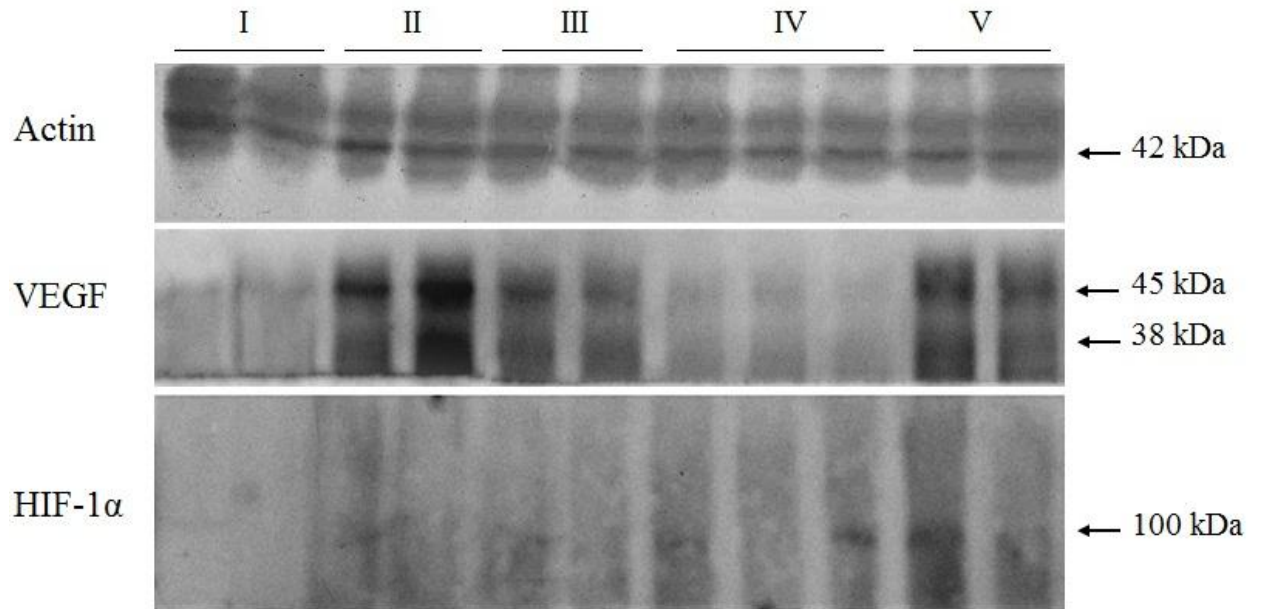
Дослідження вмісту VEGF методом імуноблотингу виявило багаторазове його збільшення у сітківці щурів з експериментальним ЦД (рис. 3.16). На 7-му добу вміст VEGF перевищував початковий рівень у 10,3 рази ( $P < 0,05$ ). Через 28 діб він був збільшеним у 8,6 разів порівнянно з початковим рівнем ( $P < 0,05$ ). На блотограмах проб контрольної групи через 7 і 28 діб були виявлені смужки на рівні 38 kDa, які відповідали вмісту мономерної форми VEGF та вказували на високий рівень його синтезу.

На тлі введення інсуліну вміст VEGF у тканині сітківки (див. рис. 3.16) залишався високим та через 28 діб перевищував початкові дані у 3,7 рази ( $P < 0,05$ ), але він був значно нижчим, ніж у контролі на 28-у добу (у 2,3 рази;  $P < 0,05$ ).

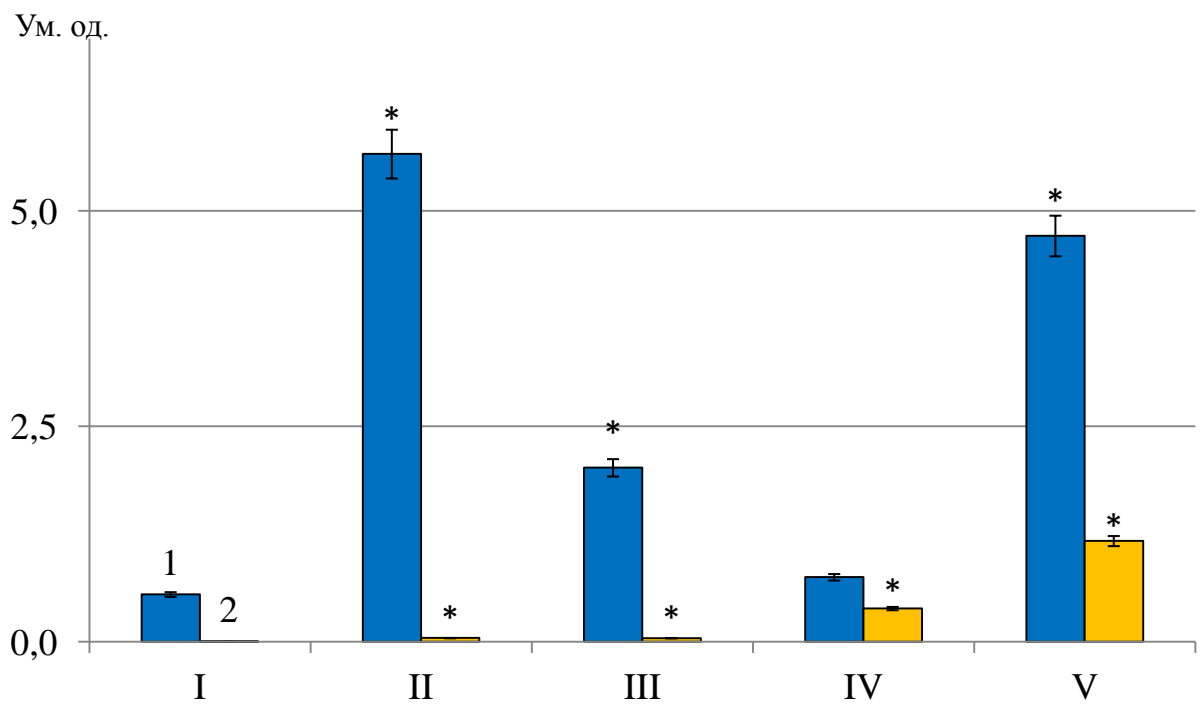
Введення інсуліну з карбацетамом блокувало викликаний гіперглікемією приріст вмісту VEGF у сітківці (див. рис. 3.16), який на 28-у добу фактично не відрізнявся від початкового рівню ( $P > 0,05$ ). У пробах цієї групи на блотограмах (див. рис. 3.16 а) не було виявлено смужки мономерної форми VEGF (38 kDa), що свідчило про низький рівень його синтезу.

Враховуючи тісний зв'язок експресії VEGF з активністю транскрипційного фактору HIF-1 $\alpha$  [65, 165], був проаналізований вміст останнього у тканині сітківки методом імуноблотингу (див. рис. 3.16). Початковий рівень HIF-1 $\alpha$  майже не відрізнявся від нульових значень, відображаючи фактичну відсутність його експресії. До значень, що піддавалися вимірюванню, вміст HIF-1 $\alpha$  піднімався на 28-у добу, сягнувши максимуму у контрольній групі.

При введенні інсуліну він був найменшим (у 27,2 разів у порівнянні з контролем;  $P < 0,05$ ), а при введенні інсуліну з карбацетамом становив середніх значень (був нижчим за контроль у 3,0 раза;  $P < 0,05$ ).



a



b

Рис. 3.16. Співвідношення вмісту VEGF/актин (1) і HIF-1α/актин (2) у тканині сітківки у контрольній групі на початку дослідження (I), через 7

і 28 діб (II і V, відповідно), а також через 28 діб у тварин після введення інсуліну (III) та інсуліну і карбацетами (IV);

а – репрезентативні блотограми актину, VEGF і HIF-1 $\alpha$ ;

б – результати денситометричного аналізу блотограм (співвідношення до вмісту актину, ум. од.);

\* –  $P < 0,05$  порівняно зі значенням на початку дослідження

Таким чином, у даному дослідженні розвиток ДР вже на ранніх термінах (7-28 діб) супроводжувався прогресуючим багаторазовим наростанням вмісту у сітківці VEGF і HIF-1 $\alpha$ , що гальмувалося при введенні як інсуліну, так і інсуліну з карбацетамом. При цьому дія карбацетами фактично блокувала приріст вмісту VEGF і суттєво зменшувала приріст вмісту HIF-1 $\alpha$ .

Морфологічно було підтверджено розвиток ДР, що можна було в динаміці спостереження відстежити у контрольній групі (рис. 3.17 а, d, g). Відмічено зниження щільності клітин у ядерних шарах сітківки, набряк всіх шарів, особливо – внутрішнього плексиформного шару, судинні аномалії у вигляді мікроаневризм, дилатації судин, мікротромбоутворення, ділянок ішемії. У нервових клітинах відмічені вакуолізація цитоплазми, клітинний набряк, пікноз ядер, що особливо було помітно у гангліонарних клітинах. Це відбивало розвиток порушень мікроциркуляції, метаболізму та дегенерацію нервових клітин.

У динаміці такі зміни наростали за термінами спостереження (7-а, 14-а та 28-а доба), при цьому, якщо спочатку виявлялися ознаки непроліферативної ДР, то на 28-у добу додавалися специфічні ознаки проліферативної ДР (рис. 3.17 g). Так, на внутрішній поверхні сітківки утворювалися мікроаневризми, в яких формувалися вогнища ангиогенезу (білі стрілки на рис. 3.17 g) з проліферацією ендотелію та утворенням декількох мікросудинних просвітів, щільно розташованих один до одного

та огорнутих товстою периваскулярною мембраною. Навколо таких судин відмічена велика кількість VEGF-позитивних клітин. Скупчення таких клітин у внутрішніх шарах сітківки передувало утворенню вогнищ ангиогенезу (чорні стрілки на рис. 3.17 а, d), що відповідало початковим явищам неоваскуляризації при ДР [103].

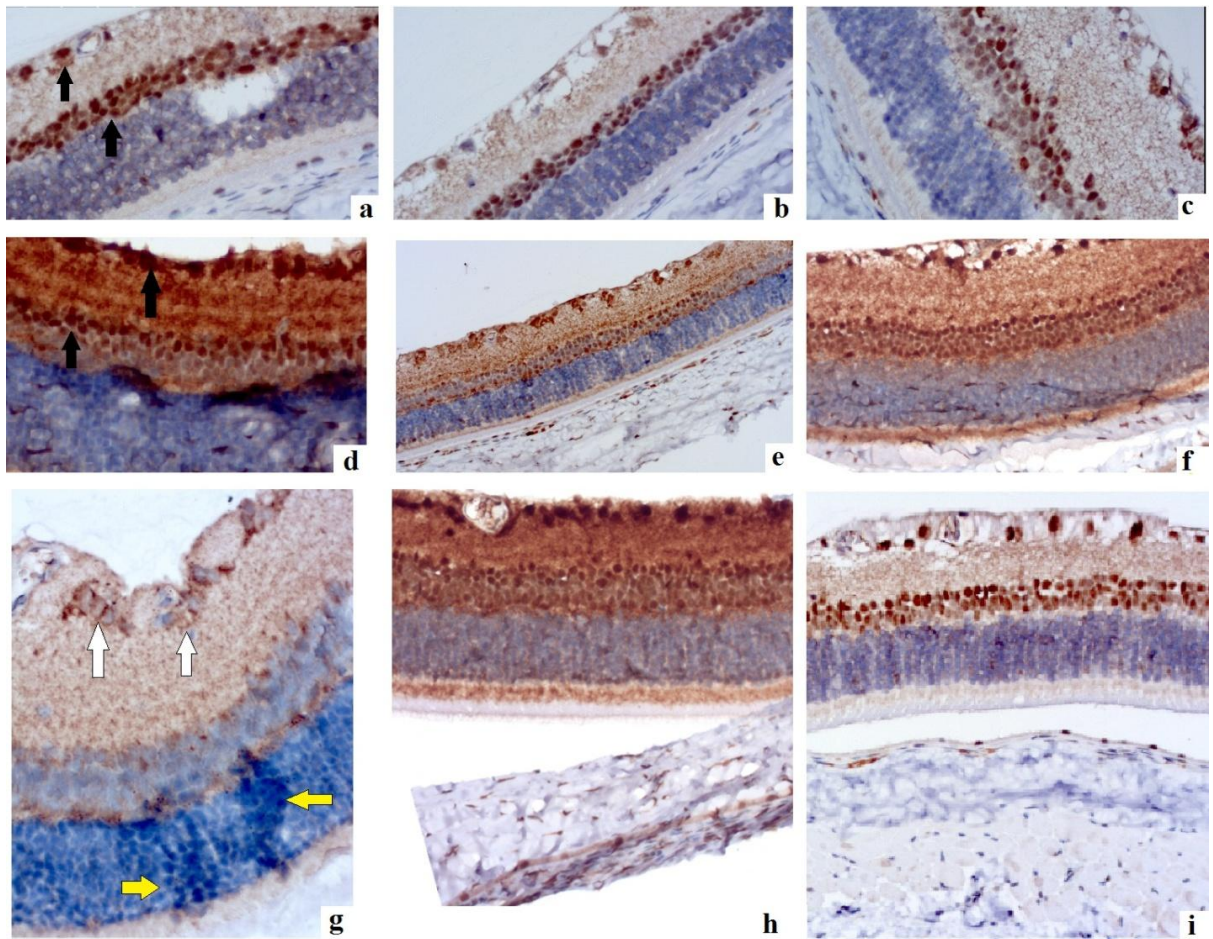


Рис. 3.17. Мікропрепарати сітківки щура. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження VEGF, дозобарвлення гематоксиліном;  
 а-f×200; g-i×400;  
 а, b, с – 7-а доба;  
 d, e, f – 14-а доба;  
 g, h, i – 28-а доба;  
 а, d, g – контрольна група,  
 b, e, h – введення інсуліну,  
 с, f, i – введення інсуліну і карбацетаму.

Ще одним проявом проліферативної ДР було утворення на 28-й день у зовнішніх шарах сітківки щурів контрольної групи клітинних проліфератів, які формувалися з інтенсивно базофільних округлих клітин (жовті стрілки на рис. 3.17 g). Ймовірно, це було відображенням гліально-мезенхімального переходу клітин Мюллера, який є основним фіброгенним механізмом при проліферативній ДР [172]. Під дією TGF- $\beta$  на тлі надекспресії VEGF відбувається трансдиференціація гліальних клітин Мюллера у міофібробласти. Як нами було показано вище, надекспресія VEGF за даними імуноблотингу була відмічена на попередніх термінах.

На тлі введення інсуліну відмічено зниження інтенсивності експресії VEGF (див. рис. 3.17 b, e, h). На 7-у добу (див. рис. 3.17 b) імуноспецифічне забарвлення зберігалось у округлих клітинах внутрішнього ядерного шару (ймовірно, клітинах Мюллера). Морфологічно на цей термін були визначені незначні ознаки непроліферативної ДР, переважно у вигляді мікроаневризми сітківки. На 14-у добу (рис. 3.17 e) імуноспецифічне забарвлення виявлялося також і у внутрішніх шарах сітківки, оточуючих мікроаневризми, а крім того – у судинах хоріоїдального сплетіння. На 28-у добу (рис. 3.17 h) інтенсивність VEGF-позитивного забарвлення була найбільшою, однак ознак проліферативної ДР на цьому терміні, на відміну від контрольної групи, помічено не було.

Комбіноване введення інсуліну і карбацетаму дозволило значно попередити розвиток ДР (див. рис. 3.17 c, f, i). VEGF-позитивне забарвлення слабкого ступеню було відзначено у окремих клітинах, що оточували незначно розширені судини у внутрішніх шарах сітківки, окремих округлих клітинах внутрішнього ядерного шару. При цьому розширені судини не формували вогнищ ангиогенезу, а у зовнішніх шарах сітківки не було відмічено клітинних проліфератів. Морфологічно шари сітківки були у збереженому стані на всіх термінах спостереження.

Таким чином, висока інтенсивність VEGF-позитивного забарвлення була притаманна осередкам специфічних морфологічних проявів ДР: на внутрішній поверхні сітківки – утворення мікроаневризм з проліферацією ендотелію та вогнищами ангиогенезу, у зовнішніх шарах сітківки – утворення клітинних проліфератів. Введення інсуліну і, ще більшою мірою, інсуліну з карбацетамом знижувало експресію VEGF, приріст вмісту HIF-1 $\alpha$  та розвиток специфічних морфологічних проявів ДР.

### **Резюме**

При діабетичному ушкодженні сітківки спостерігався розвиток процесів нейродегенерації. NSE-позитивне забарвлення мали гангліонарні клітини, нейрони внутрішнього та зовнішнього ядерних шарів та внутрішній сегмент фоторецепторів. Розвиток ДР супроводжувався збільшенням інтенсивності забарвлення до 14-ї доби, після чого воно було на досить низькому рівні. У плексиформних шарах визначено прогресуюче зниження інтенсивності NF-H-позитивного забарвлення. У шарі нервових волокон воно дещо збільшувалося, але концентрувалося переважно навколо розширених мікросудин. На 28-му добу було відмічено зникнення NF-H-позитивного забарвлення. Реакція глії сітківки характеризувалася поступовою активацією із першочерговим залученням астроцитів внутрішніх шарів сітківки, потім – клітин Мюллера по типу реактивного гліозу. GFAP-позитивні клітини тісно контактували з вогнищами патологічного ангиогенезу, а також брали участь в утворенні клітинних проліфератів. Інтенсивність S100-позитивного забарвлення клітин Мюллера значно зростала, чітко візуалізувалися їх довгі радіальні відростки. Інтенсивне забарвлення S100 відмічено у зовнішньому ядерному шарі та на його межі з шаром паличок і колобочок, а також – у шарі гангліонарних клітин. На 28-у добу у внутрішніх шарах сітківки

виявлялися мікроаневризми, з якими щільно контактували інтенсивно забарвлені S100-позитивні відростки. Вміст VEGF і каспази-3 та їх експресія у тканинах сітківки були значно збільшеними. Застосування інсуліну і, більшою мірою, інсуліну з карбацетамом сприяло зберіганню NSE-позитивних нервових клітин та запобігало втраті NF- $\kappa$ B-позитивного забарвлення у шарах сітківки, знижувало експресію GFAP, білка S100, каспази-3 та VEGF, попереджало розвиток реактивного гліозу, ангиогенезу та утворення клітинних проліфератів.

**Даний розділ висвітлено в матеріалах наступних публікацій:**

1. Зяблицев СВ, Жупан ДБ, Дядик ОО. Вплив бензодіазепінових рецепторів на стан глії при розвитку діабетичної ретинопатії. Фізіологічний журнал. 2023; 69(6):33-42. <https://doi.org/10.15407/fz69.06.033> [7].
2. Ziablitsev SV, Zhupan DB, Tykhomyrov AO, Dyadyk OO. Benzodiazepine receptor agonist Carbacetam modulates the level of vascular endothelial growth factor in the retina of rats with streptozotocin-induced diabetes. Ukr Biochem J. 2023.;6(95):21-29. <https://doi.org/10.15407/ubj95.06.021> [192].
3. Ziablitsev SV, Zhupan DB. The state of S100-positive glia and the effect on it on the GABA-benzodiazepine receptor agonist, carbacetam, in diabetic retinopathy. Journal of Ophthalmology (Ukraine). 2024;3(518):33-39. <https://doi.org/10.31288/oftalmolzh2024333339> [193].
4. Зяблицев СВ, Жупан ДБ. Експресія нейрон-специфічної енолази в сітківці та вплив на неї агоніста бензодіазепінових рецепторів карбацетаму при експериментальній діабетичній ретинопатії. Архів офтальмології України. 2024;12(1):9-15. <https://doi.org/10.22141/2309-8147.12.1.2024.350> [4].



5. Зябліцев СВ, Жупан ДБ. Експресія нейрофіламентів у сітківці при експериментальній діабетичній ретинопатії та вплив агоністу бензодіазепінових рецепторів карбацетаму. Медична наука України. 2024;20(1):80-88. <https://doi.org/10.32345/2664-4738.1.2024.11> [5].

## РОЗДІЛ 4

### АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

На сьогодні визнано, що у патогенезі ДР, поряд з розвитком судинних порушень, у сітківці незалежно розвивається дисфункція нейронів та процеси нейродегенерації [106]. Їх розвитку сприяють метаболічні порушення, мітохондріальна дисфункція, зниження ефективності аксональної передачі, нейрозапалення та інші фактори [131]. Головними задачами даної роботи було встановлення ранніх проявів та механізмів розвитку нейродегенерації сітківки при її діабетичному ураженні та обґрунтування нового напрямку її корекції шляхом активації ГАМК-ергічної медіації.

#### *Маркери нейродегенерації сітківки (експресія NSE та NF-HL)*

Метою цього фрагменту роботи було виявлення проявів нейродегенерації сітківки шляхом визначення експресії маркерів нервових елементів сітківки (NSE та NF-HL) на початкових стадіях розвитку експериментальної ДР та вплив на неї агоністу бензодіазепінових рецепторів карбацетаму.

Відомо, що у сітківці антитіла до NSE мітять субпопуляцію фоторецепторних клітин у зовнішньому ядерному шарі, а також гангліонарні, амакринові, біполярні і горизонтальні клітини у внутрішніх шарах сітківки [107]. У наших дослідженнях в контрольній групі було відмічено активне забарвлення гангліонарних клітин, а також нейронів внутрішнього та зовнішнього ядерних шарів і внутрішнього сегменту фоторецепторів. При цьому інтенсивність їх забарвлення була високою до 14-ї доби, тоді як через 28 діб – лишалася порівняно низкою.

Такі результати давали змогу припустити, що в перші 2 тижні гіперглікемії наростали компенсаторні метаболічні реакції, що супроводжувалося активацією гліколізу та відображалось у збільшенні

експресії NSE. У подальшому з фактору компенсації NSE міг перетворюватися на фактор пошкодження. Наростання фонового NSE-позитивного забарвлення та виявлення сплетінь нервових волокон вказувало на розповсюдження його експресії по нейрітам та позаклітинно.

Відомо, що після пошкодження NSE швидко переходить з цитозоллю нервових клітин на їх поверхню, де вона може діяти як рецептор плазміногену, активувати міграцію макрофагів і мікроглії до місця пошкодження та сприяти загибелі нейронних клітин [58]. Активацію як мікро- так і макроглії з розвитком реактивного гліозу було нами показано при вивченні відповідних маркерів (GFAP і S100), що мало максимум саме на ці терміни дослідження.

У нервовій тканині NSE може стимулювати виробництво активних форм кисню, оксиду азоту та різних цитокінів (таких як TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$ , TGF- $\beta$  та MCP-1) з посиленням запалення через активацію сигнальних шляхів фосфатидилінозитол-4,5-бісфосфат-3-кінази (PI3K), мітоген-активованої протеїнкінази (MAPK) і кінази RhoA [60]. У наших дослідженнях також було показано надерекспресію HIF-1 $\alpha$  і VEGF у сітківці.

Через 28 днів при відсутності лікування на тлі розвитку специфічних морфологічних проявів ДР (мікроаневризм та клітинних проліфератів сітківки) була показана слабка експресія NSE, що саме і відображало процеси нейродегенерації. З цих позицій збереження NSE-позитивного забарвлення у нейронах сітківки при введенні інсуліну та карбацетаму відображало запобігання процесам діабетогенної нейродегенерації. Відсутність специфічних морфологічних ознак ДР (мікроаневризм та клітинних проліфератів) також доводило це припущення.

На моделі травми спинного мозку було показано значне зниження тканинної експресії NSE, сироваткових запальних цитокінів/хемокінів, метаболічних факторів і матричних металопротеїназ після застосування

нового маломолекулярного інгібітора енолази ENOblock [59]. Ці результати підтвердили гіпотезу про те, що активацію гліальних клітин і стан запалення можна модулювати регуляцією експресії та активності NSE.

У наших експериментах застосування інсуліну і, більшою мірою, карбацетаму на ранніх термінах гальмувало надмірну експресію NSE, а у віддалених термінах сприяло збереженню нейронів, тобто – фактично запобігало нейродегенерації сітківки. Крім того, нами був показаний позитивний ефект карбацетаму на ранній ДР, що полягало у запобіганні розвитку таких морфологічних ознак, як реактивний гліоз, утворення мікроаневризм та клітинних проліфератів.

Чітким маркером нейродегенерації вважається експресія структурних нейрональних білків – нейрофіламентів. Їх імуногістохімічне виявлення вже на 7-му добу показало фактичне зникнення NF-H-позитивного забарвлення аксонів гангліонарних клітин; у зовнішньому плексиформному шарі спостерігалось зменшення щільності NF-H-позитивних аксонів горизонтальних клітин та інтенсивності їх забарвлення, у внутрішньому плексиформному шарі суттєво знижувалася інтенсивність NF-H-позитивного забарвлення відростків амакринових клітин, яке зникало на 28-му добу.

Причиною цього явища могла бути активація апоптозу, що було нами окремо підтверджено. Дегенерацію амакринових клітин зі зниженням їх оптокінетичної відповіді встановлено у пацієнтів з ранніми проявами діабетичної мікроангіопатії сітківки [91]. За іншими даними при експериментальному діабеті у мишей вже на ранніх етапах відбувається втрата дофамінергічних та холінергічних амакринових клітин [51].

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

Крім апоптозу, хронічна гіперглікемія за умов ЦД сприяє активації окисного стресу, нагромадженню кінцевих продуктів глікування (AGEs), а також накопиченню глутамату, що через активацію прозапальних протеїнкіназних шляхів обумовлює мітохондріальну дисфункцію, енергодефіцит, перенавантаження нервових клітин кальцієм, стрес ендоплазматичного ретикулуму і, як загальний наслідок, – загибель нервових елементів сітківки [11, 84]. Відоме патогенне значення мікрооточення нейронів – надмірна активація мікроглії та клітин Мюллера у вигляді реактивного гліозу, що навіть передуює розвитку мікроангіопатії [101, 131].

При експериментальній гіперглікемії було показано ключове значення для формування змін активності нейронів сітківки порушення гальмівних процесів через пригнічення вивільнення ГАМК на тлі глутаматної ексайтотоксичності, що перезбуджувало гангліонарні клітини [39]. В наших дослідженнях було встановлено ранню (вже на 7-му добу) втрату відростків NF-H-позитивних аксонів у шарі нервових волокон, що також відображало ранні процеси нейродегенерації сітківки. На відміну від гангліонарних та амакринових клітин, більш стійкими до гіперглікемії виявилися горизонтальні нейрони зовнішнього плексиформного шару, однак на 28-му добу NF-H-позитивне забарвлення їх нервових волокон також було суттєво зниженим.

В культивованих нейронах кори головного мозку миші також відмічено ранню дегенерацію аксонів після ексайтотоксичності, яка була викликана хронічним впливом каїнової кислоти, та була пов'язана з активацією каспази-3 в аксональному відділі [72]. Морфологічно це характеризувалося потовщенням і фрагментацією аксонів, що мало схожість з Валлеровою дегенерацією, відбувалося руйнування цитоскелета нейронів, зокрема – деполімеризація мікротрубочок. Також показано швидке (протягом 24-годинного періоду) зникнення нейрофіламентів з

аксонів кортикальних нейронів у відповідь на ексайтотоксичну дію, тоді як інші маркери цитоскелету аксонів (такі як бета III-тубулін) залишалися інтактними [33].

В експерименті була показана наявність ГАМК-рецепторів на амакринових та гангліонарних нейронах сітківки [120]. При цьому при експериментальній ДР показано зниження вивільнення ГАМК та дофаміну у сітківці на тлі значного збільшення вмісту глутамату [40, 44]. Посилення імунореактивності глутаматних NMDA-рецепторів спостерігалось в гангліозних, амакринових і біполярних клітинах, а також у внутрішньому і зовнішньому плексиформних шарах сітківки при експериментальному стрептозотоциновому діабеті у щурів [96]. Також виявлено зниження активності та експресії рецепторів ГАМК у сітківці за умов ЦД, а їх блокування прискорювало загибель гангліонарних клітин [98].

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

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

#### *Маркери макро- і мікроглії сітківки (експресія GFAP та S100)*

Згідно з єдиною теорією діабетичних ускладнень Браунлі, діабетичні пошкодження індукуються окисно-відновними процесами та епігенетичними змінами у сприйнятливих клітинах та тканинах [25]. Ці внутрішньоклітинні процеси спричиняють взаємозалежний розвиток

гліальної, нервової та мікросудинної дисфункції [131]. Гіперглікемія досить швидко призводить до накопичення токсичних метаболічних продуктів, що викликає проліферацію мікроглії та її трансформацію від протизапального до прозапального стану [56]. Активована мікроглія залучає клітини Мюллера та астроцити, які в нормі знаходяться у стані спокою, що супроводжується розвитком реактивного гліозу, маркером якого є GFAP [144]. У свою чергу реактивний гліоз посилює надекспресію прозапальних цитокінів, збільшує проникність мікросудин сітківки та проліферацію ендотелію в ішемізованих ділянках [179]. Хронічна або надмірна активація гліальних клітин Мюллера має суттєву токсичну дію на гангліонарні клітини [110].

Метою цього фрагменту роботи було з'ясування ранніх реакцій глії сітківки в процесі формування ДР та вплив на такі процеси карбацетаму.

Відомо, що GFAP є маркером реактивного гліозу в сітківці [78]. У нормі він експресується переважно астроцитами, тоді як у клітинах Мюллера ця експресія значно нижча. При ЦД останні проявляють аберантну надекспресію GFAP [31]. Це відповідало нашим результатам – на 7-й день експресія GFAP виявлялася у астроцитах шару нервових волокон, тоді як пізніше долучалися клітини Мюллера, відростки яких радіально пересікали внутрішні шари сітківки.

Гіперглікемія призводить до першочергової реакції мікроглії, яка активується при накопиченні продуктів вуглеводного метаболізму з утворенням прооксидантів, активації індукцибельної синтази оксиду азоту (iNOS), ядерного транскрипційного фактора NF-κB та інших ростових факторів [46]. Пізніше прозапальні цитокіни, а також TGF-β і VEGF індукують реактивний гліоз та гліально-мезенхімальний перехід клітин Мюллера у міофібробласти з розвитком фіброзу сітківки [172]. Гліоз клітин Мюллера є особливою рисою ДР, маркером чого є надекспресія GFAP, а також прозапальних цитокінів, хемокінів і VEGF, залучення

лейкоцитів та запуск хронічного запалення і ангиогенезу [160]. При ЦД клітини Мюллера мають низку аномальних функцій, вони стають гліозними, погіршують депонування калію, поглинання глутамату та ГАМК, експресують модулятори ангиогенезу [45].

Отже, глії вже на початкових етапах розвитку ДР належить ключова патогенетична роль у формуванні основних патологічних процесів – ангиогенезу та фіброзу сітківки. Крім того, розвиток специфічної діабетичної нейродегенерації сітківки також є наслідком її надмірної активації [84]. При цьому дегенеративні зміни нейронів внутрішніх шарів сітківки передують клінічним проявам ДР. Більше того, реактивний гліоз, втрата функцій й апоптоз нейронів виникають задовго перед мікроангіопатією [131].

Натомість у нашому дослідженні чітко показано, що основні патологічні процеси у сітківці – гліоз, ангиопатія, клітинні проліферати виникають практично одночасно вже на ранніх етапах ДР. Аналіз літературних даних доводить, що причиною їх розвитку є універсальний механізм активації патологічних клітинних каскадів з утворення надмірної кількості прозапальних медіаторів і факторів росту, що запускає хронічне проліферативне запалення.

Цитопатологічні зміни при ДР торкаються як мінімум дев'яти видів клітин сітківки, включаючи перицити, клітини пігментного епітелію сітківки, горизонтальні, біполярні та амакринові клітини, фоторецептори, гангліонарні клітини сітківки, мікро- та макроглію [106, 180]. З ушкодженням глії тісно пов'язана низка механізмів, найважливішим з яких є збуджуюча токсичність глутамату, що підсилює процеси метаболізму, каспазного каскаду і апоптозу. Пусковим механізмом цих пошкоджень є накопичення внутрішньоклітинного кальцію, що дозволяє вважати активацію експресії кальцій-зв'язуючих білків відображенням протективних механізмів, але, разом з цим – й маркером кальцієвого



перенавантаження нервових клітин [41, 82, 96].

У нашому дослідженні у щурів на початку дослідження (ще до моделювання ЦД) виявлені особливості розподілу тканинної експресії кальцій-зв'язуючого білку S100 у сітківці. Інтенсивне забарвлення численних поліморфних клітин внутрішнього ядерного шару підтверджувало конститутивний характер експресії S100, який приймає активну участь у регуляції функцій нервових клітин [108, 145, 163, 174]. Відростки цих клітин були позитивно забарвлені тільки поблизу від їх тіл, що вказувало на переважно соматичну локалізацію S100.

Інтенсивне забарвлення нервових волокон, які утворювали щільні округлі муфти навколо гангліонарних клітин, на нашу думку, мало астроцитарне походження. Астроцити забезпечують нейрони енергетичними субстратами та регулюють вироблення трофічних факторів і антиоксидантів [46]. У відповідь на метаболічний стрес за умов гіперглікемії астроцити продукують прозапальні інтерлейкіни, хемокіни, циклооксигеназу-2, численні фактори росту, які беруть участь у активації мікроглії, рекрутуванні моноцитів/макрофагів, Т-клітин та дендритних клітин, посилюючи запальну реакцію [110]. Астроцити сітківки в нормі експресують GFAP, у той час як у клітинах Мюллера ця експресія значно нижча [31].

Нами показано, що окремі GFAP-позитивні астроцити та їх відростки виявлялися на початку експерименту тільки у шарах гангліонарних клітин та нервових волокон і тільки поодинокі дифузно розташовані GFAP-позитивні клітини (ймовірно клітини Мюллера) виявлялися у внутрішньому ядерному шарі. У процесі розвитку ДР появлялися чіткі GFAP-позитивні радіальні волокна, які через внутрішній плексіформний шар прямували до внутрішнього ядерного шару, де були помітні численні GFAP-позитивні відросткові клітини. Ймовірно, ця картина відображала динаміку залучення клітин Мюллера, які у нормі слабо експресують GFAP,

але активуються при ЦД [78].

На відміну від GFAP, білок S100 мав досить високий рівень експресії у нервових клітинах сітківки в нормі. У подальшому розвиток ДР супроводжувався надексперсією астроцитами внутрішніх шарів сітківки як GFAP, так і S100. Це відображало їх надмірну активацію та могло бути причиною раннього формування мікроаневризм на внутрішній поверхні сітківки, що було виявлено у контрольній групі на 28-му добу.

У контрольній групі експресія S100 протягом експерименту збільшувалася перед усім у клітинах Мюллера – крупних відросткових нейронах внутрішнього ядерного шару та їх відростках, які радіально пересікали всі шари сітківки і чітко візуалізувалися. Розповсюдження S100-позитивного забарвлення на радіальні довгі відростки клітин свідчило про значне перенавантаження кальцієм та відповідало активації апоптозу сітківки.

Наростання інтенсивності S100-позитивного забарвлення клітин Мюллера могло пояснюватися також і моделями глутаматної ексайтотоксичності сітківки при ЦД [24]. ЦД порушує рівновагу глутамату і глутаміну між гліальними клітинами і нейронами шляхом зниження активності глутамінсинтетази в клітинах Мюллера, що перешкоджає здатності цих клітин перетворювати надлишок глутамату в глутамін, а, з іншого боку, – порушує процес окиснення глутамату до  $\alpha$ -кетоглутарату, що призводить до позаклітинного накопичення глутамату. Для підтримки позаклітинної концентрації глутамату нижче нейротоксичного рівня необхідні транспортери, основним і домінуючим з яких є переносник глутамату-аспартату (GLAST), якій експресується клітинами Мюллера, на які припадає не менше 50% поглинання глутамату в сітківці ссавців [117]. У сітківці діабетичних щурів експресія GLAST знижена [61].

Нещодавно було встановлено, що рецептор RAGE є мішенню не тільки для AGEs, але й для членів сімейства білків S100 [163]. Отже, це

може пояснювати перетворення важливого захисного механізму від глутаматної ексайтотоксичності (зв'язування клітинного кальцію) у механізм пошкодження через активацію RAGE та ініціювання нейрозапалення та дегенерації.

Окремо можна зазначити зникнення при розвитку ДР численних поліморфних S100-позитивних клітин внутрішнього ядерного шару. Гіперглікемія викликає вироблення реактивних метаболітів – AGEs, наприклад, метилгліоксалу, що веде до зниження функції біполярних клітин [122]. Визначено, що при ЦД спостерігається осередкова дегенерація амакринових клітин із зниженням їх оптокінетичної відповіді [91]. У нашому дослідженні показана активація апоптозу (за експресією каспази-3) клітин цього шару сітківки. Отже зниження активності, а можливо, й загибель цих клітин відбувалася вже на ранніх стадіях експериментальної ДР.

Посилення імунореактивності глутаматних NMDA-рецепторів спостерігалось в гангліонарних, амакринових і біполярних клітинах, а також у внутрішньому і зовнішньому плексиформних шарах сітківки при експериментальному стрептозотоциновому діабеті у щурів [96]. Це відбувалося одночасно з посиленням імунореактивності білків, що зв'язують кальцій (кальбіндину та парвальбуміну).

З таких міркувань можна пояснити активацію експресії S100 у вигляді облямівки на межі зовнішнього ядерного шару і шару паличок і колбочок, що належала клітинам пігментного епітелію, які подовжувалися у зовнішній ядерний шар. Фоторецептори мають високі метаболічні потреби, дуже чутливі до запальних реакцій та й самі є осередком окислювального стресу у сітківці при ДР [70]. Експериментально доведено, що фоторецептори продукують молекули клітинної адгезії (ICAM-1), циклооксигеназу-2 та індукцибельну NO-синтазу (iNOS), цитокіни, що стимулює вироблення TNF- $\alpha$  в лейкоцитах і ендотелії судин

[151]. Отже, активація експресії S100 у клітинах пігментного епітелію могла відображати компенсаторну реакцію при накопиченні кальцію у фоторецепторах.

У нашому дослідженні показано, що відновлення ГАМК-ергічної медіації через застосування агоніста бензодіазепінових рецепторів карбацетаму є можливим напрямком патогенетичної корекції діабетичної нейрональної дисфункції. Застосування інсуліну і карбацетаму значно послаблювало експресію CFAR і S100 у клітинах внутрішнього ядерного шару та радіальних відростках клітин Мюллера.

Найбільшою мірою протективний ефект карбацетаму проявився через 28 діб, коли слабе імунопозитивне забарвлення спостерігалось у поодиноких клітинах Мюллера внутрішнього ядерного шару та сплетінні волокон астроцитів шару гангліонарних волокон. Вочевидь застосування карбацетаму запобігало розвитку патогенетичних механізмів нейродегенерації при ДР. Доказове значення має відсутність аневризм внутрішніх шарів сітківки у тварин цієї групи.

#### *Маркери ангиогенезу і гіпоксії (експресія VEGF та HIF-1 $\alpha$ )*

Одним з основних механізмів пошкодження сітківки при ЦД є порушення функціонування ретинальної нейроваскулярної одиниці, яка включає нейрони сітківки, глію та ендотелій судин [18]. Першими проявами ДР є інтраретинальні мікросудинні аномалії, що супроводжується набряком внаслідок підвищення проникності судин і неоваскуляризацією через гіпоксію та активацію потужного транскрипційного фактору – HIF-1 $\alpha$  та залежного від нього VEGF [165]. Капілярна недостатність призводить до гіпоксії/ішемії і запускає патологічний ангиогенез, що, у свою чергу, посилює гіпоксію сітківки, запалення, імунну дисфункцію та замикає патологічне коло прогресування ДР [168]. Судини, які утворюються, є незрілими, високопроникними та легко розриваються, призводячи до внутрішньоочних крововиливів [37,

154].

Більшість сучасних терапевтичних стратегій, включаючи антитіла проти VEGF (анти-VEGF-терапія), спрямовані на лікування пізніх стадій (діабетичний макулярний набряк і проліферативна ДР) і не в змозі попередити пошкодження нейронів [89, 128]. Отже, актуальним є дослідження ранніх факторів, що призводять до діабетичних уражень сітківки та обґрунтування нових терапевтичних підходів, спрямованих на усунення не тільки судинних, але й нейронних порушень.

Метою даного фрагменту роботи було встановлення впливу агоніста бензодіазепінових рецепторів карбацетами на ретинальну експресію VEGF і HIF-1 $\alpha$  на ранніх етапах розвитку ДР.

Як на сьогодні встановлено, саме дисфункція ретинальної нерооваскулярної одиниці сприяє таким мікросудинним змінам, як мікроаневризми, мікрокрововиливи, інфаркти нервових волокон (ватні плями), відкладення ексудату (тверді ексудати), утворення безклітинних та неперфузованих капілярів, зниження цілісності та збільшення проникності судин сітківки [19]. Розквіт таких змін ми спостерігали на 28-му добу експерименту в контрольній групі.

Встановлено, що гіпоксія через захист HIF-1 $\alpha$  від деградації та утворення HIF-1 активує експресію VEGF, що призведе до судинної гіперпроникності та неоваскуляризації сітківки [165]. Однак, як показали результати нашого дослідження, на тлі надекспресії VEGF вже з 7-ї доби, збільшення вмісту HIF-1 $\alpha$  відбувалося тільки на 28-у добу і, відповідно, не пояснювало активацію VEGF на ранніх термінах. Певною мірою ці дані можна було вважати парадоксальними, оскільки вони вказували на наявність інших, ніж HIF-1 $\alpha$  активаторів ранньої експресії VEGF. Як було показано вище, до таких факторів могла належати активація мікро-, а згодом, макроглії сітківки, що було підтверджено при вивченні гліальних маркерів – GFAP і S100. Також таке припущення підтверджували дані по

встановленню ролі реактивного гліюзу сітківки при ДР, коли активована глія стає джерелом запальних та ростових факторів [131].

Принципова можливість активації експресії VEGF через HIF-1 $\alpha$  незалежні механізми показана для клітин гепатоцелюлярної карциноми Нер3В [32], де регуляція VEGF переважно контролюється шляхами Akt/PI3K і SP1 і не залежить від HIF-1 в умовах гіпоксії.

В цьому плані знаходить пояснення здатність карбацетаму знижувати ранню експресію VEGF, за рахунок залучення ГАМК-ергічних механізмів. Показово, що у наших дослідженнях активація VEGF поступово охоплювала шари сітківки, починаючи з шару гангліонарних клітин, потім – ядерних шарів, а згодом – всіх шарів. Логічно це можна пов'язати із недостатністю гальмівних механізмів нервової регуляції, а саме – ГАМК-ергічної медіації [40], дефіцит якої за умов ДР і відновлював карбацетам. Іншими словами, здатність карбацетаму гальмувати надмірну активацію глії запобігала надекспресії VEGF і розвитку мікросудинних порушень при ДР.

Таким чином, при гіперглікемічному стресі мікроглія активується та може сприяти ушкодженню нейронів внаслідок секреції нейротоксичних та прозапальних факторів [30]. Наші дослідження підтвердили можливість стимуляції експресії VEGF активованою мікроглією.

Крім того, за умов гіперглікемії могла активуватися макроглія. Залучення клітин Мюллера і астроцитів призводило до розвитку реактивного гліюзу, який також пов'язаний з надекспресією VEGF та прозапальних цитокінів [144]. При ЦД клітини Мюллера мають низку аномальних функцій, вони стають гліозними, погіршують депонування калію, поглинання глутамату та ГАМК, експресують модулятори ангиогенезу [45]. Саме надмірна активація глії є причиною специфічної діабетичної нейродегенерації сітківки [84]. Отже, дія карбацетаму могла пояснюватися гальмівним впливом на мікро- та макроглію за умов ДР.

У нашому дослідженні було чітко показано, що основні патологічні процеси у сітківці – гліоз, ангіопатія, клітинні проліферати виникають практично одночасно вже на ранніх стадіях ДР. Аналіз літературних даних доводить, що причиною їх розвитку є універсальний механізм активації патологічних клітинних каскадів з утворенням надмірної кількості прозапальних медіаторів і факторів росту [37, 131, 165, 168]. Але, позитивні ефекти ГАМК-ергічного препарату висвітлюють і роль нейрохімічних порушень, корекція яких може суттєво відновлювати функцію ретинальної нейроваскулярної одиниці та гальмувати надекспресію клітинних регуляторів. Дослідження *in vitro* показали, що зміни активності нейронів сітківки при ДР пов'язані зі зниженням гальмівних процесів через дефіцит ГАМК, збільшення вивільнення глутамату та посилення збудження гангліонарних клітин [39].

Вивчення дисфункції нейросітківки на ранніх стадіях ЦД [29] висвітлює можливі клітинні механізми, що пояснювали отримані результати. В нормі амакринові клітини типу A17 забезпечують інгібування ГАМК-ергічного зворотного впливу на біполярні клітини. При ЦД кальцієва проникність синаптичних рецепторів клітин A17 знижена, що призведе до пригнічення вивільнення ГАМК з наступним розгальмуванням і збільшенням вивільнення глутамату з біполярних клітин [29].

Таким чином, відновлення ГАМК-ергічної медіації є можливим напрямком патогенетичної корекції нейрональної дисфункції сітківки при ДР. Дане дослідження показує перспективність випробування карбацетаму для попередження діабетогенного пошкодження сітківки.

#### *Патогенетичне обґрунтування використання карбацетаму*

Важливу роль у процесах дисфункції нейронів сітківки при ДР відіграє порушення гальмівних процесів через пригнічення вивільнення ГАМК, збільшення вивільнення глутамату та посилення збудження

гангліонарних клітин [39]. При цьому вже на ранніх стадіях ДР спостерігається дисфункція нейросітківки незалежно від розвитку класичної мікроангіопатії, а відновлення ГАМК-ергічної медіації є перспективним напрямком корекції нейрональної дисфункції [29].

Бензодіазепіновий анестетик мідазолам запобігав індукованому гіперглікемією мікросудинному витоку в сітківці мишей з ЦД через пригнічення клітинної дії VEGF, утворення активних форм кисню і активації трансглутамінази в ендотеліальних клітинах сітківки людини [77]. Ці ефекти скасувалися антагоністом рецепторів ГАМК типу А (GABA<sub>A</sub>) флумазенілом.

Також берберин, який має властивості агоніста ГАМК А-рецепторів у щурів з ЦД збільшував виживаність гангліонарних клітин, зменшував їх апоптоз та значно покращував зорову функцію через шлях рецептора ГАМК- $\alpha$ -протеїнкінази С- $\alpha$  (GABAAR/PKC- $\alpha$ ) [44].

На сьогодні вже відомий перший препарат, що отримав схвалення Управління з контролю якості харчових продуктів та лікарських засобів США (FDA) для лікування діабетичної невропатії – аналог ГАМК (S)-3-(амінометил)-5-метілгексанова кислота (прегабалін), яка зв'язується з допоміжною субодиницею ( $\alpha 2-d$  білком) потенціалзалежних кальцієвих каналів у центральній нервовій системі [15]. У щурів з ЦД препарат покращував метаболізм, знижував інтенсивність запалення, апоптозу та гістопатологічні аномалії сітківки, а також вміст глутамату через посилення ГАМК-ергічної регуляції.

Таким чином, відновлення ГАМК-ергічної медіації нейронів сітківки може розглядатися як патогенетично обґрунтований напрямок корекції специфічної нейродегенерації при ДР. В цьому плані перспективним препаратом є карбацетам, який також показав низку позитивних ефектів при інших патологічних процесах і, у тому числі, при експериментальному ЦД [16, 74, 75, 190].



Основною його дією є модулююча, що запобігає надмірній активації регуляторних систем при дії патогенних факторів. Такий вплив загалом характерний для бензодіазепінів, які, наприклад, при хворобі Альцгеймера покращують клінічні результати внаслідок алостеричної модуляції ГАМК [16].

У даному дослідженні показаний вплив карбацетаму на зниження при ДР експресії GFAP, каспази-3, VEGF та HIF-1 $\alpha$  при збільшенні експресії NSE і нейрофіламентів. Це дозволяло обґрунтувати його використання для запобігання нейродегенерації та збереження нейронів сітківки, гальмування надмірної активації глії, апоптозу та патологічного ангиогенезу, що попереджало розвиток ранніх проявів ДР – реактивного гліозу, ангиогенезу, клітинних проліфератів тощо.

## ВИСНОВКИ

1. Серед неінфекційних захворювань цукровий діабет вийшов на перші позиції за медико-соціальною значущістю та має всі ознаки пандемії. Найчастішою з причин інвалідизації пацієнтів з діабетом є офтальмологічні ускладнення, зокрема – діабетична ретинопатія. Останнім часом доведений незалежний розвиток нейродегенерації сітківки, що передуює запальним та судинним проявам. До ознак нейродегенеративного процесу відносяться активація нейроглії з нейронофагією (реактивний гліоз), втрата гангліонарних клітин, дегенерація та апоптоз нейронів, астроцитів та клітин Мюллера, порушення нейромедіаторних відносин (глутаматна ексайтотоксичність і ГАМК-ергічний дефіцит). Ці міркування є обґрунтуванням для використання ГАМК-ергічних препаратів при ДР. Серед таких уваги заслуговує ендогенний модулятор ГАМК-бензодіазепінового рецепторного комплексу, похідне  $\beta$ -карболіну карбацетам, розроблений в Інституті фізико-органічної хімії та вуглекімії НАН України. Відомі властивості карбацетаму дозволяють припустити можливість його використання для патогенетично обґрунтованої корекції нейрохімічного дисбалансу за умов діабетичного пошкодження сітківки.

2. Через 7 діб після моделювання діабетичного ураження сітківки на тлі стабільної гіперглікемії виявлено зниження щільності нервових клітин та розрихлення нервових волокон. У подальшому наростали розрідження клітин у ядерних шарах, гіпохромія нейронів з вакуолізацією цитоплазми, екстрацелюлярний набряк, знижувалася щільність нервових волокон у плексиформних шарах. Гангліонарні клітини мали виражену вакуолізацію, а подекуди гіперхромію цитоплазми, пікноз ядер. Ці зміни прогресували на тлі таких проявів ДР як набряк з ділянками ішемії, повнокрів'я і дилатація судин, утворення мікроаневризм у внутрішніх шарах (з 14-ї доби) та

клітинних проліфератів у зовнішніх шарах сітківки (з 28-ї доби). Такі зміни вказували на паралельний розвиток нейродегенеративних змін, судинних і проліферативних аномалій у сітківці вже на ранніх термінах розвитку ДР. Лікування інсуліном покращувало стан сітківки, а додавання до його введення карбацетаму попереджало розвиток нейродегенерації при діабетичному пошкодженні сітківки.

3. Виражене NSE-позитивне забарвлення у сітківці щурів з експериментальною ДР мали гангліонарні клітини, нейрони внутрішнього та зовнішнього ядерних шарів та внутрішній сегмент фоторецепторів. З 14-ї доби інтенсивність забарвлення суттєво знижувалася, тоді як у внутрішньому ядерному шарі з'являлося фонове забарвлення, на тлі якого візуалізувалися численні нервові волокна. Застосування інсуліну і, більшою мірою, інсуліну з карбацетамом сприяло зберіганню NSE-позитивних нервових клітин, зменшенню фонового забарвлення та запобігало розвитку нейродегенерації сітківки.

4. NF-H-позитивне забарвлення відмічено у поздовжніх нервових волокнах, які за морфологією відповідали аксонам горизонтальних та амакринових клітин; а також у волокнах та аксональних пагорбах гангліонарних нейронів. При розвитку ДР у плексиформних шарах сітківки спостерігалось прогресуюче зниження інтенсивності NF-H-позитивного забарвлення. У шарі нервових волокон забарвлені елементи концентрувалися навколо розширених мікросудин, які мали тенденцію до утворення мікроаневризм. На 28-му добу у внутрішньому плексиформному шарі було відмічено зникнення NF-H-позитивного забарвлення. Введення інсуліну сприяло менш вираженому зниженню інтенсивності NF-H-позитивного забарвлення, а введення карбацетаму запобігало його втраті у шарах сітківки, імуноспецифічні волокна зовнішнього плексиформного шару зберігали високу інтенсивність забарвлення, більш чітку структуру нервових сплетінь, які продовжувалися

у внутрішній ядерний шар.

5. Реакція глії сітківки при розвитку ДР за результатами імуногістохімічного виявлення GFAP характеризувалася поступовою активацією із першочерговим залученням астроцитів внутрішніх шарів сітківки, потім – клітин Мюллера (реактивний гліоз). GFAP-позитивні клітини тісно контактували з вогнищами патологічного ангиогенезу внутрішніх шарів сітківки, а також брали участь в утворенні клітинних проліфератів у зовнішніх шарах. Вміст GFAP у тканинах сітківки за результатами імуноблотінгу суттєво зростав. Карбацетам знижував експресію та вміст GFAP та каспази-3 у сітківці та попереджував розвиток реактивного гліозу, ангиогенезу та утворення клітинних проліфератів.

6. S100-позитивне забарвлення мали тіла численних поліморфних клітин внутрішнього ядерного шару та гліальні волокна, що муфтоподібно охоплювали тіла гангліонарних нейронів. При розвитку ДР інтенсивність S100-позитивного забарвлення клітин Мюллера значно зростала, чітко візуалізувалися їх довгі радіальні відростки. Інтенсивне забарвлення відмічено у зовнішньому ядерному шарі та на його межі з шаром паличок і колобочок, а також – у шарі гангліонарних клітин. На 28-у добу у внутрішніх шарах сітківки виявлялися мікроаневризми, з якими щільно контактували інтенсивно забарвлені S100-позитивні астроцитарні відростки. Застосування інсуліну приводило до послаблення інтенсивності S100-позитивного забарвлення, а комбіноване введення інсуліну і карбацетаму гальмувало експресію білка S100 і запобігало утворенню мікроаневризму сітківки. На 28-у добу забарвлення слабкої інтенсивності зберігалось тільки у поодиноких клітинах Мюллера внутрішнього ядерного шару та нервових сплетіннях у шарі гангліонарних волокон.

7. При розвитку ДР у тканинах сітківки суттєво зростав вміст VEGF. Його експресія була активована як у внутрішніх, так і у зовнішніх шарах

сітківки у містах утворення мікроаневризм та клітинних проліфератів. При введенні інсуліну вміст VEGF був нижчим, ніж у контролі, а введення інсуліну з карбацетамом блокувало приріст вмісту VEGF у сітківці. Введення інсуліну і, більшою мірою, інсуліну з карбацетамом дозволило суттєво попередити розвиток ДР та знизити інтенсивність VEGF-позитивного забарвлення у всіх шарах сітківки. Вміст HIF-1 $\alpha$  у сітківці піднімався лише на 28-у добу, що значно зменшувалося при введенні інсуліну і карбацетаму.

8. Впровадження в наукову та педагогічну діяльність отриманих результатів здійснювалося в Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця, Харківському національному медичному університеті, Тернопільському державному медичному університеті імені І.Я. Горбачевського, Одеському національному медичному університеті, Медичному інституті Сумського державного університету, Полтавському державному медичному університеті, Івано-Франківському національному медичному університеті, Буковинському державному медичному університеті, Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

У даному дослідженні показано попередження розвитку нейродегенерації у сітківці при введенні агоністу ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетаму, що доводило важливу роль ГАМК-ергічного дефіциту при діабетичному ураженні сітківки.

Збереження нейронів сітківки, гальмування надмірної активації глії, апоптозу та патологічного ангиогенезу є підставою для подальшої розробки цього напрямку патогенетичної корекції з метою запобігання розвитку процесів нейродегенерації, а також попередження судинних і проліферативних патологічних процесів при ДР.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Жупан ДБ. Ретинальна експресія васкулоендотеліального фактора росту у тканинах сітківки при експериментальній діабетичній ретинопатії та вплив агоніста бензодіазепінових рецепторів карбацетаму. Мат-ли VI науково-практичної internet-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція», м. Харків, 16 листопада 2023 р. 2023:201.
2. Жупан ДБ, Зябліцев СВ. Ефект агоністу бензодіазепінових рецепторів карбацетаму на експресію нейрофіламентів у сітківці при експериментальному цукровому діабеті. Зб. наук. праць за матеріалами ХХ Всеукраїнської наукової конференції «Актуальні питання біології та медицини», м. Лубни, 24 травня 2024 р. Лубни : Вид-во ДЗ «ЛНУ імені Тараса Шевченка». 2024:79-81.
3. Жупан ДБ, Зябліцев СВ, Заріцька ОО, Бабенко МС. Гліальні реакції при розвитку ранньої діабетичної ретинопатії та вплив агоністу гамк-бензодіазепінових рецепторів карбацетаму. В кн.: Бюлетень мат-лів наук. конф. ХХІІІ читання В.В. Підвисоцького (16-17 травня 2024 р.). Одеса: УкрНДІ медицини транспорту. 2024:52-54.
4. Зябліцев СВ, Жупан ДБ. Експресія нейрон-специфічної енолази в сітківці та вплив на неї агоніста бензодіазепінових рецепторів карбацетаму при експериментальній діабетичній ретинопатії. Архів офтальмології України. 2024;12(1):9-15. <https://doi.org/10.22141/2309-8147.12.1.2024.350>.
5. Зябліцев СВ, Жупан ДБ. Експресія нейрофіламентів у сітківці при експериментальній діабетичній ретинопатії та вплив агоністу бензодіазепінових рецепторів карбацетаму. Медична наука України. 2024;20(1):80-88. <https://doi.org/10.32345/2664-4738.1.2024.11>.
6. Зябліцев СВ, Водяник ВВ, Дядик ОО. Вплив блокади тирозинових протеїнкіназ на експресію васкулоендотеліального фактора

росту та розвиток діабетичної ретинопатії. Фізіологічний журнал. 2023;69(5):22-32.

7. Зябліцев СВ, Жупан Д.Б, Дядик ОО. Вплив бензодіазепінових рецепторів на стан глії при розвитку діабетичної ретинопатії. Фізіологічний журнал. 2023; 69(6):33-42. <https://doi.org/10.15407/fz69.06.033>.

8. Зябліцев СВ, Жупан Д.Б. Експресія гліального фібрилярного протеїну (GFAP) у сітківки при експериментальному стрептозотоциновому діабеті. В кн.: Бюллетень мат-лів наук. конф. XXII читання ім. В.В. Подвисоцького (18-19 травня 2023 р.). Одеса: УкрНДІ медицини транспорту. 2023:81-82.

9. Кирилюк МЛ, Ищенко ВА. Патогенез диабетической ретинопатии: обзор литературы. *International Journal of Endocrinology*. 2019; 15(7):567-575.

10. Михейцева ІМ, Молчанюк НІ, Мохаммад Абдулхаді, Коломійчук СГ, Супрун О.О. Ультраструктурні зміни елементів хоріоретинального комплексу щурів після моделювання деприваційної осьової міопії, діабетичної ретинопатії та при їх поєднанні. *Офтальмол. журн.*, 2021;4:72-78. <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh202147278>.

11. Abramoff MD, Fort PE, Han IC, Jayasundera KT, Sohn EH, Gardner TW. Approach for a Clinically Useful Comprehensive Classification of Vascular and Neural Aspects of Diabetic Retinal Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018 Jan 1;59(1):519-527. doi: 10.1167/iovs.17-21873.

12. Ahmed SA, Ghoneim DF, Morsy ME, Hassan AA, Mahmoud ARH. Low-Level Laser Therapy with 670 nm Alleviates Diabetic Retinopathy in an Experimental Model. *J Curr Ophthalmol*. 2021 Jul 5;33(2):143-151. doi: 10.4103/joco.joco\_29\_20.

13. Al Zabadi H, Taha I, Zagha R. Clinical and Molecular Characteristics of Diabetic Retinopathy and Its Severity Complications among



Diabetic Patients: A Multicenter Cross-Sectional Study. *J Clin Med.* 2022 Jul 7;11(14):3945. doi: 10.3390/jcm11143945.

14. Alegria-Schaffer A. Western blotting using chemiluminescent substrates. *Methods Enzymol.* 2014;541:251-259.

15. Ali SA, Zaitone SA, Dessouki AA, Ali AA. Pregabalin affords retinal neuroprotection in diabetic rats: Suppression of retinal glutamate, microglia cell expression and apoptotic cell death. *Exp Eye Res.* 2019 Jul;184:78-90. doi: 10.1016/j.exer.2019.04.014.

16. Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Saad HM, Batiha GE. Benzodiazepines in Alzheimer's disease: beneficial or detrimental effects. *Inflammopharmacology.* 2023 Feb;31(1):221-30. doi: 10.1007/s10787-022-01099-4.

17. Amoaku WM, Ghanchi F, Bailey C, Banerjee S, Banerjee S, Downey L, Gale R, Hamilton R, Khunti K, Posner E, Quhill F, Robinson S, Setty R, Sim D, Varma D, Mehta H. Diabetic retinopathy and diabetic macular oedema pathways and management: UK Consensus Working Group. *Eye (Lond).* 2020 Jun;34(Suppl 1):1-51. doi: 10.1038/s41433-020-0961-6.

18. Antonetti DA, Silva PS, Stitt AW. Current understanding of the molecular and cellular pathology of diabetic retinopathy. *Nat Rev Endocrinol.* 2021 Apr;17(4):195-206. doi: 10.1038/s41574-020-00451-4.

19. Arboleda-Velasquez JF, Valdez CN, Marko CK, D'Amore PA. From pathobiology to the targeting of pericytes for the treatment of diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep.* 2015 Feb;15(2):573. doi: 10.1007/s11892-014-0573-2.

20. Asadova V, Gul Z, Buyukuysal RL, Yalcinbayir O. Assessment of neuron-specific enolase, S100B and malondialdehyde levels in serum and vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Int Ophthalmol.* 2020 Jan;40(1):227-234. doi: 10.1007/s10792-019-01175-9.

21. Aschauer J, Pollreisz A, Karst S, Hülsmann M, Hajdu D, Datlinger

F, Egner B, Kriechbaum K, Pablik E, Schmidt-Erfurth UM. Longitudinal analysis of microvascular perfusion and neurodegenerative changes in early type 2 diabetic retinal disease. *Br J Ophthalmol*. 2022 Apr;106(4):528-533. doi: 10.1136/bjophthalmol-2020-317322.

22. Atıl A, Deniz A. Could be serum uric acid a risk factor for thrombosis and/or uveitis in Behcet's disease? *Vascular*. 2018;26:378–386. doi: 10.1177/1708538117742831.

23. Bianco L, Arrigo A, Aragona E, Antropoli A, Berni A, Saladino A, Battaglia Parodi M, Bandello F. Neuroinflammation and neurodegeneration in diabetic retinopathy. *Front Aging Neurosci*. 2022 Aug 16;14:937999. doi: 10.3389/fnagi.2022.937999.

24. Bogdanov P, Corraliza L, Villena JA, Carvalho AR, Garcia-Arumí J, Ramos D, Ruberte J, Simó R, Hernández C. The db/db mouse: a useful model for the study of diabetic retinal neurodegeneration. *PLoS One*. 2014 May 16;9(5):e97302. doi: 10.1371/journal.pone.0097302.

25. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005 Jun;54(6):1615-25. doi: 10.2337/diabetes.54.6.1615.

26. Busa P, Kuthati Y, Huang N, Wong CS. New Advances on Pathophysiology of Diabetes Neuropathy and Pain Management: Potential Role of Melatonin and DPP-4 Inhibitors. *Front Pharmacol*. 2022 Apr 12;13:864088. doi: 10.3389/fphar.2022.864088.

27. Campochiaro PA, Peters KG. Targeting Tie2 for Treatment of Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema. *Curr Diab Rep*. 2016 Dec;16(12):126. doi: 10.1007/s11892-016-0816-5.

28. Capello M, Ferri-Borgogno S, Cappello P, Novelli F.  $\alpha$ -Enolase: a promising therapeutic and diagnostic tumor target. *FEBS J*. 2011 Apr;278(7):1064-74. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08025.x.

29. Castilho Á, Ambrósio AF, Hartveit E, Veruki ML. Disruption of a

neural microcircuit in the rod pathway of the mammalian retina by diabetes mellitus. *J Neurosci.* 2015 Apr 1;35(13):5422-33. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5285-14.2015.

30. Chang KC, Shieh B, Petrash JM. Role of aldose reductase in diabetes-induced retinal microglia activation. *Chem Biol Interact.* 2019 Apr 1;302:46-52. doi: 10.1016/j.cbi.2019.01.020.

31. Cheung AK, Fung MK, Lo AC, Lam TT, So KF, Chung SS, Chung SK. Aldose reductase deficiency prevents diabetes-induced blood-retinal barrier breakdown, apoptosis, and glial reactivation in the retina of db/db mice. *Diabetes.* 2005 Nov;54(11):3119-25. doi: 10.2337/diabetes.54.11.3119.

32. Choi SB, Park JB, Song TJ, Choi SY. Molecular mechanism of HIF-1-independent VEGF expression in a hepatocellular carcinoma cell line. *Int J Mol Med.* 2011 Sep;28(3):449-54. doi: 10.3892/ijmm.2011.719.

33. Chung RS, McCormack GH, King AE, West AK, Vickers JC. Glutamate induces rapid loss of axonal neurofilament proteins from cortical neurons in vitro. *Exp Neurol.* 2005b Jun;193(2):481-8. doi: 10.1016/j.expneurol.2005.01.005.

34. Cohen SR, Gardner TW. Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema. *Dev Ophthalmol.* 2016;55:137-46. doi: 10.1159/000438970.

35. Corliss BA, Ray HC, Doty RW, Mathews C, Sheybani N, Fitzgerald K, Prince R, Kelly-Goss MR, Murfee WL, Chappell J, Owens GK, Yates PA, Peirce SM. Pericyte Bridges in Homeostasis and Hyperglycemia. *Diabetes.* 2020 Jul;69(7):1503-1517. doi: 10.2337/db19-0471.

36. Dabbs D. *Diagnostic Immunohistochemistry, 4th Edition Theranostic and genomic applications.* 2014. 960 p.

37. Duh EJ, Sun JK, Stitt AW. Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies. *JCI Insight.* 2017 Jul 20;2(14):e93751. doi: 10.1172/jci.insight.93751.

38. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group.

Grading Diabetic Retinopathy from Stereoscopic Color Fundus Photographs - An Extension of the Modified Airlie House Classification: ETDRS Report Number 10. *Ophthalmology*. 2020 Apr;127(4S):S99-S119. doi: 10.1016/j.ophtha.2020.01.030.

39. Eggers ED, Carreon TA. The effects of early diabetes on inner retinal neurons. *Vis Neurosci*. 2020 Sep 16;37:E006. doi: 10.1017/S095252382000005X.

40. Eggers ED. Visual Dysfunction in Diabetes. *Annu Rev Vis Sci*. 2023 May 10. doi: 10.1146/annurev-vision-111022-123810.

41. Eggers K, Sikora K, Lorenz M, Taubert T, Moobed M, Baumann G, Stangl K, Stangl V. RAGE-dependent regulation of calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 in human THP-1. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2011 Jun;119(6):353-7. doi: 10.1055/s-0030-1268426.

42. El-Remessy AB, Al-Shabrawey M, Khalifa Y, Tsai NT, Caldwell RB, Liou GI. Neuroprotective and blood-retinal barrier-preserving effects of cannabidiol in experimental diabetes. *Am J Pathol*. 2006 Jan;168(1):235-44. doi: 10.2353/ajpath.2006.050500.

43. Fahmideh F, Marchesi N, Campagnoli LIM, Landini L, Caramella C, Barbieri A, Govoni S, Pascale A. Effect of troxerutin in counteracting hyperglycemia-induced VEGF upregulation in endothelial cells: a new option to target early stages of diabetic retinopathy? *Front Pharmacol*. 2022 Aug 15;13:951833. doi: 10.3389/fphar.2022.951833.

44. Fang W, Huang X, Wu K, Zong Y, Yu J, Xu H, Shi J, Wei J, Zhou X, Jiang C. Activation of the GABA-alpha receptor by berberine rescues retinal ganglion cells to attenuate experimental diabetic retinopathy. *Front Mol Neurosci*. 2022 Aug 9;15:930599. doi: 10.3389/fnmol.2022.930599.

45. Fletcher EL, Phipps JA, Ward MM, Puthussery 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.

46. Fresta CG, Fidilio A, Caruso G, Caraci F, Giblin FJ, Leggio GM, Salomone S, Drago F, Bucolo C. A New Human Blood-Retinal Barrier Model Based on Endothelial Cells, Pericytes, and Astrocytes. *Int J Mol Sci*. 2020 Feb 27;21(5):1636. doi: 10.3390/ijms21051636.

47. Fudalej E, Justyniarska M, Kasarełło K, Dziedziak J, Szaflik JP, Cudnoch-Jędrzejewska A. Neuroprotective Factors of the Retina and Their Role in Promoting Survival of Retinal Ganglion Cells: A Review. *Ophthalmic Res*. 2021;64(3):345-355. doi: 10.1159/000514441.

48. Gao S, Zhang Y, Zhang M. Targeting Novel Regulated Cell Death: Pyroptosis, Necroptosis, and Ferroptosis in Diabetic Retinopathy. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Jun 23;10:932886. doi: 10.3389/fcell.2022.932886.

49. Gardner TW, Davila JR. The neurovascular unit and the pathophysiologic basis of diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2017 Jan;255(1):1-6. doi: 10.1007/s00417-016-3548-y.

50. Gardner TW, Sundstrom JM. A proposal for early and personalized treatment of diabetic retinopathy based on clinical pathophysiology and molecular phenotyping. *Vision Res*. 2017 Oct;139:153-160. doi: 10.1016/j.visres.2017.03.006.

51. Gastinger MJ, Singh RS, Barber AJ. Loss of cholinergic and dopaminergic amacrine cells in streptozotocin-diabetic rat and Ins2Akita-diabetic mouse retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Jul;47(7):3143-50. doi: 10.1167/iovs.05-1376.

52. GBD 2019 Blindness and Vision Impairment Collaborators; Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: the Right to Sight: an analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet Glob Health*. 2021 Feb;9(2):e144-e160. doi: 10.1016/S2214-109X(20)30489-7. Epub 2020 Dec 1.

Erratum in: *Lancet Glob Health*. 2021 Apr;9(4):e408.

53. Ghamdi AHA. Clinical Predictors of Diabetic Retinopathy Progression; A Systematic Review. *Curr Diabetes Rev*. 2020;16(3):242-247. doi: 10.2174/1573399815666190215120435.

54. Ghasemi A, Jeddi S. Streptozotocin as a tool for induction of rat models of diabetes: a practical guide. *EXCLI J*. 2023 Feb 21;22:274-294. doi: 10.17179/excli2022-5720.

55. Goyal SN, Reddy NM, Patil KR, Nakhate KT, Ojha S, Patil CR, Agrawal YO. Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes - A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. *Chem Biol Interact*. 2016 Jan 25;244:49-63. doi: 10.1016/j.cbi.2015.11.032.

56. Grigsby JG, Cardona SM, Pouw CE, Muniz A, Mendiola AS, Tsin AT, Allen DM, Cardona AE. The role of microglia in diabetic retinopathy. *J Ophthalmol*. 2014;2014:705783. doi: 10.1155/2014/705783.

57. Grover S, Piyasena PN, Zondervan M, Bascaran C. Perspectives on the provision of diabetic retinopathy screening: Survey of eye health care professionals in Haryana. *Indian J Ophthalmol*. 2022 Jun;70(6):2057-2060. doi: 10.4103/ijo.IJO\_2642\_21.

58. Haque A, Ray SK, Cox A, Banik NL. Neuron specific enolase: a promising therapeutic target in acute spinal cord injury. *Metab Brain Dis*. 2016 Jun;31(3):487-95. doi: 10.1007/s11011-016-9801-6.

59. Haque A, Capone M, Matzelle D, Cox A, Banik NL. Targeting Enolase in Reducing Secondary Damage in Acute Spinal Cord Injury in Rats. *Neurochem Res*. 2017 Oct;42(10):2777-2787. doi: 10.1007/s11064-017-2291-z.

60. Haque A, Polcyn R, Matzelle D, Banik NL. New Insights into the Role of Neuron-Specific Enolase in Neuro-Inflammation, Neurodegeneration, and Neuroprotection. *Brain Sci*. 2018 Feb 18;8(2):33. doi: 10.3390/brainsci8020033.

61. Hernández C, Dal Monte M, Simó R, Casini G. Neuroprotection as a Therapeutic Target for Diabetic Retinopathy. *J Diabetes Res.* 2016;2016:9508541. doi: 10.1155/2016/9508541.
62. Hernández C, García-Ramírez M, Corraliza L, Fernández-Carneado J, Farrera-Sinfreu J, Ponsati B, González-Rodríguez A, Valverde AM, Simó R. Topical administration of somatostatin prevents retinal neurodegeneration in experimental diabetes. *Diabetes.* 2013 Jul;62(7):2569-78. doi: 10.2337/db12-0926.
63. Hernández C, Simó-Servat O, Porta M, Grauslund J, Harding SP, Frydkjaer-Olsen U, García-Arumí J, Ribeiro L, Scanlon P, Cunha-Vaz J, Simó R; European Consortium for the Early Treatment of Diabetic Retinopathy (EUROCONDOR). Serum glial fibrillary acidic protein and neurofilament light chain as biomarkers of retinal neurodysfunction in early diabetic retinopathy: results of the EUROCONDOR study. *Acta Diabetol.* 2023 Jun;60(6):837-844. doi: 10.1007/s00592-023-02076-1.
64. Himasa FI, Singhal M, Ojha A, Kumar B. Prospective for Diagnosis and Treatment of Diabetic Retinopathy. *Curr Pharm Des.* 2022;28(7):560-569. doi: 10.2174/1381612827666211115154907.
65. Huang H, He J, Johnson D, Wei Y, Liu Y, Wang S, Luttly GA, Duh EJ, Semba RD. Deletion of placental growth factor prevents diabetic retinopathy and is associated with Akt activation and HIF1 $\alpha$ -VEGF pathway inhibition. *Diabetes.* 2015 Jan;64(1):200-12. doi: 10.2337/db14-0016.
66. Ikeda T, Nakamura K, Oku H, Horie T, Kida T, Takai S. Immunohistological Study of Monkey Foveal Retina. *Sci Rep.* 2019 Mar 27;9(1):5258. doi: 10.1038/s41598-019-41793-y.
67. Kaur C, Sivakumar V, Foulds WS, Luu CD, Ling EA. Hypoxia-induced activation of N-methyl-D-aspartate receptors causes retinal ganglion cell death in the neonatal retina. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012 Apr;71(4):330-47. doi: 10.1097/NEN.0b013e31824deb21.

68. Kaur C, Sivakumar V, Foulds WS. Early response of neurons and glial cells to hypoxia in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Mar;47(3):1126-41. doi: 10.1167/iovs.05-0518.
69. Kawasako K, Oshikata T, Kanno T, Hamamura M. Neurofilament Accumulation in Rabbit Retinas. *J Comp Pathol*. 2015 Nov;153(4):283-6. doi: 10.1016/j.jcpa.2015.07.002. Epub 2015 Aug 17. PMID: 26292767.
70. Kern TS, Berkowitz BA. Photoreceptors in diabetic retinopathy. *J Diabetes Investig*. 2015 Jul;6(4):371-80. doi: 10.1111/jdi.12312.
71. Kim K, Kim ES, Kim DG, Yu SY. Progressive retinal neurodegeneration and microvascular change in diabetic retinopathy: longitudinal study using OCT angiography. *Acta Diabetol*. 2019 Dec;56(12):1275-1282. doi: 10.1007/s00592-019-01395-6.
72. King AE, Southam KA, Dittmann J, Vickers JC. Excitotoxin-induced caspase-3 activation and microtubule disintegration in axons is inhibited by taxol. *Acta Neuropathol Commun*. 2013 Sep 9;1:59. doi: 10.1186/2051-5960-1-59.
73. Kitada M, Ogura Y, Monno I, Koya D. Sirtuins and Type 2 Diabetes: Role in Inflammation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Function. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Mar 27;10:187. doi: 10.3389/fendo.2019.00187.
74. Kmet OG, Ziablitsev SV, Filipets ND, Kmet TI, Slobodian XV. Carbacetam effect on behavioral reactions in experimental Alzheimer's disease. *Archives of the Balkan Medical Union*. 2019 March; 54(1):124-129. doi: 10.31688/ABMU.2019.54.1.17.
75. Kmet OG, Ziablitsev SV, Filipets ND. Peculiarities of the antioxidant protection and nitrogen oxide systems of the brain in rats with experimental type 2 diabetes mellitus after carbacetam administration. *Int J Endocrinol*. 2019;15(5):376-80. doi: 10.22141/2224-0721.15.5.2019.180040.
76. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.



77. Lee YJ, Kim M, Lee JY, Jung SH, Jeon HY, Lee SA, Kang S, Han ET, Park WS, Hong SH, Kim YM, Ha KS. The benzodiazepine anesthetic midazolam prevents hyperglycemia-induced microvascular leakage in the retinas of diabetic mice. *FASEB J*. 2018 May 21:fj201800014RR. doi: 10.1096/fj.201800014RR.

78. Lelyte I, Ahmed Z, Kaja S, Kalesnykas G. Structure-Function Relationships in the Rodent Streptozotocin-Induced Model for Diabetic Retinopathy: A Systematic Review. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2022 May;38(4):271-286. doi: 10.1089/jop.2021.0128.

79. Li J, Yan M, Zhang Y, Xie M, Yan L, Chen J. Serum neuron-specific enolase is elevated as a novel indicator of diabetic retinopathy including macular oedema. *Diabet Med*. 2015 Jan;32(1):102-7. doi: 10.1111/dme.12597.

80. Lieth E, LaNoue KF, Antonetti DA, Ratz M. Diabetes reduces glutamate oxidation and glutamine synthesis in the retina. The Penn State Retina Research Group. *Exp Eye Res*. 2000 Jun;70(6):723-30. doi: 10.1006/exer.2000.0840.

81. Lim RR, Vaidya T, Gadde SG, Yadav NK, Sethu S, Hainsworth DP, Mohan RR, Ghosh A, Chaurasia SS. Correlation between systemic S100A8 and S100A9 levels and severity of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr*. 2019 Mar-Apr;13(2):1581-1589. doi: 10.1016/j.dsx.2019.03.014.

82. Liu J, Li S, Sun D. Calcium Dobesilate and Micro-vascular diseases. *Life Sci*. 2019a Mar 15;221:348-353. doi: 10.1016/j.lfs.2019.02.023.

83. Löhre S, Brandstätter JH, Boycott BB, Peichl L. Expression of neurofilament proteins by horizontal cells in the rabbit retina varies with retinal location. *J Neurocytol*. 1995 Apr;24(4):283-300. doi: 10.1007/BF01186541.

84. Lynch SK, Abramoff MD. Diabetic retinopathy is a neurodegenerative disorder. *Vision Res*. 2017 Oct;139:101-107. doi: 10.1016/j.visres.2017.03.003.

85. Madeira MH, Marques IP, Ferreira S, Tavares D, Santos T, Santos AR, Figueira J, Lobo C, Cunha-Vaz J. Retinal Neurodegeneration in Different Risk Phenotypes of Diabetic Retinal Disease. *Front Neurosci.* 2021 Dec 21;15:800004. doi: 10.3389/fnins.2021.800004.

86. Marangos PJ, Schmechel D, Zis AP, Goodwin FK. The existence and neurobiological significance of neuronal and glial forms of the glycolytic enzyme enolase. *Biol Psychiatry.* 1979 Aug;14(4):563-79. PMID: 385064.

87. Marques IP, Ferreira S, Santos T, Madeira MH, Santos AR, Mendes L, Lobo C, Cunha-Vaz J. Association between Neurodegeneration and Macular Perfusion in the Progression of Diabetic Retinopathy: A 3-Year Longitudinal Study. *Ophthalmologica.* 2022;245(4):335-341. doi: 10.1159/000522527.

88. Martins J, Elvas F, Brudzewsky D, Martins T, Kolomiets B, Tralhão P, Gøtzsche CR, Cavadas C, Castelo-Branco M, Woldbye DP, Picaud S, Santiago AR, Ambrósio AF. Activation of Neuropeptide Y Receptors Modulates Retinal Ganglion Cell Physiology and Exerts Neuroprotective Actions In Vitro. *ASN Neuro.* 2015 Aug 26;7(4):1759091415598292. doi: 10.1177/1759091415598292.

89. Maturi RK, Glassman AR, Josic K, Antoszyk AN, Blodi BA, Jampol LM, Marcus DM, Martin DF, Melia M, Salehi-Had H, Stockdale CR, Punjabi OS, Sun JK; DRCR Retina Network. Effect of Intravitreal Anti-Vascular Endothelial Growth Factor vs Sham Treatment for Prevention of Vision-Threatening Complications of Diabetic Retinopathy: The Protocol W Randomized Clinical Trial. *JAMA Ophthalmol.* 2021 Jul 1;139(7):701-712. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2021.0606.

90. Mehrabadi ME, Salemi Z, Babaie 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 Dec;42(6):639-644. doi: 10.1016/j.jcjd.2018.03.008.

91. Midená E, Torresin T, Longhin E, Midená G, Pilotto E, Frizziero L. Early Microvascular and Oscillatory Potentials Changes in Human Diabetic Retina: Amacrine Cells and the Intraretinal Neurovascular Crosstalk. *J Clin Med*. 2021 Sep 7;10(18):4035. doi: 10.3390/jcm10184035.

92. Montesano G, Ometto G, Higgins BE, Das R, Graham KW, Chakravarthy U, McGuinness B, Young IS, Kee F, Wright DM, Crabb DP, Hogg RE. Evidence for Structural and Functional Damage of the Inner Retina in Diabetes With No Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2021 Mar 1;62(3):35. doi: 10.1167/iovs.62.3.35.

93. Mrugacz M, Bryl A, Zorena K. Retinal Vascular Endothelial Cell Dysfunction and Neuroretinal Degeneration in Diabetic Patients. *J Clin Med*. 2021 Jan 25;10(3):458. doi: 10.3390/jcm10030458.

94. Mykheitseva IM, Molchaniuk NI, Abdulhadi Muhammad, Kolomiichuk SG, Suprun OO. Ultrastructural changes in the chorioretinal complex of the rat after inducing form-deprivation axial myopia only, diabetic retinopathy only and diabetic retinopathy in the presence of myopia. *J ophthalmol* (Ukraine). 2021;4:72-78. <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh202147278>

95. Nadal-Nicolás FM, Galindo-Romero C, Lucas-Ruiz F, Marsh-Amstrong N, Li W, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Pan-retinal ganglion cell markers in mice, rats, and rhesus macaques. *Zool Res*. 2023 Jan 18;44(1):226-248. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2022.308.

96. Ng YK, Zeng XX, Ling EA. Expression of glutamate receptors and calcium-binding proteins in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain Res*. 2004 Aug 20;1018(1):66-72. doi: 10.1016/j.brainres.2004.05.055.

97. Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linnenkamp U, Guariguata L, Cho NH, Cavan D, Shaw JE, Makaroff LE. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract*. 2017 Jun;128:40-50. doi: 10.1016/j.diabres.2017.03.024.

98. Okumichi H, Mizukami M, Kiuchi Y, Kanamoto T. GABA A receptors are associated with retinal ganglion cell death induced by oxidative stress. *Exp Eye Res.* 2008 May;86(5):727-33. doi: 10.1016/j.exer.2008.01.019.

99. Oshitari T. Diabetic retinopathy: neurovascular disease requiring neuroprotective and regenerative therapies. *Neural Regen Res.* 2022 Apr;17(4):795-796. doi: 10.4103/1673-5374.322457.

100. Pankiv VI. Type 2 diabetes mellitus: current international guidelines, personalized approach and real outpatient practice. *Mižnarodnij endokrinologičnij žurnal.* 2020;16(6):463-470. doi: 10.22141/2224-0721.16.6.2020.215384. [in Ukrainian].

101. Pitale PM, Gorbatyuk MS. Diabetic Retinopathy: From Animal Models to Cellular Signaling. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 27;23(3):1487. doi: 10.3390/ijms23031487.

102. Podkowinski D, Orłowski-Wimmer E, Zlabinger G, Pollreisz A, Mursch-Edlmayr AS, Mariacher S, Ring M, Bolz M. Aqueous humour cytokine changes during a loading phase of intravitreal ranibizumab or dexamethasone implant in diabetic macular oedema. *Acta Ophthalmol.* 2020 Jun;98(4):e407-e415. doi: 10.1111/aos.14297.

103. Proia AD, Caldwell MC. Intraretinal neovascularization in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 2010 Jan;128(1):142-4. doi: 10.1001/archophthalmol.2009.338.

104. Qin YJ, Chan SO, Lin HL, Zhang YQ, He BT, Zhang L, Yu HH, Chu WK, Pang CP, Zhang HY. Increased Expression of Growth Hormone-Releasing Hormone in Fibrinous Inflammation of Proliferative Diabetic Retinopathy. *Am J Ophthalmol.* 2020 Jul;215:81-90. doi: 10.1016/j.ajo.2020.02.006.

105. Qihua Shen, John B. Hiebert, Julie Hartwell, Amanda R., Thimmesch BA, Janet D. Pierce Systematic Review of Traumatic Brain Injury and the Impact of Antioxidant Therapy on Clinical Outcomes. *Worldviews on*

Evidence-Based Nursing. 2016; 13(5):380-9.

106. Ren J, Zhang S, Pan Y, Jin M, Li J, Luo Y, Sun X, Li G. Diabetic retinopathy: Involved cells, biomarkers, and treatments. *Front Pharmacol*. 2022 Aug 9;13:953691. doi: 10.3389/fphar.2022.953691.

107. Rich KA, Zhan Y, Blanks JC. Migration and synaptogenesis of cone photoreceptors in the developing mouse retina. *J Comp Neurol*. 1997 Nov 10;388(1):47-63. PMID: 9364238.

108. Riva M, Källberg E, Björk P, Hancz D, Vogl T, Roth J, Ivars F, Leanderson T. Induction of nuclear factor- $\kappa$ B responses by the S100A9 protein is Toll-like receptor-4-dependent. *Immunology*. 2012 Oct;137(2):172-82. doi: 10.1111/j.1365-2567.2012.03619.x.

109. Rozanska O, Uruska A, Zozulinska-Ziolkiewicz D. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Diabetes. *Int J Mol Sci*. 2020 Jan 28;21(3):841. doi: 10.3390/ijms21030841.

110. Rübsam A, Parikh S, Fort PE. Role of Inflammation in Diabetic Retinopathy. *Int J Mol Sci*. 2018 Mar 22;19(4):942. doi: 10.3390/ijms19040942.

111. Rungger-Brändle E, Dosso AA, Leuenberger PM. Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000 Jun;41(7):1971-80.

112. Saddala MS, Lennikov A, Huang H. Placental growth factor regulates the pentose phosphate pathway and antioxidant defense systems in human retinal endothelial cells. *J Proteomics*. 2020 Apr 15;217:103682. doi: 10.1016/j.jprot.2020.103682.

113. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, Colagiuri S, Guariguata L, Motala AA, Ogurtsova K, Shaw JE, Bright D, Williams R; IDF Diabetes Atlas Committee. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9<sup>th</sup> edition. *Diabetes Res Clin Pract*. 2019 Nov;157:107843. doi: 10.1016/j.diabres.2019.107843.

114. Samuels IS, Portillo JC, Miao Y, Kern TS, Subauste CS. Loss of CD40 attenuates experimental diabetes-induced retinal inflammation but does not protect mice from electroretinogram defects. *Vis Neurosci*. 2017 Jan;34:E009. doi: 10.1017/S0952523817000074.

115. Sanz-González SM, García-Medina JJ, Zanón-Moreno V, López-Gálvez MI, Galarreta-Mira D, Duarte L, Valero-Velló M, Ramírez AI, Arévalo JF, Pinazo-Durán MD, On Behalf Of The Valencia Study Group On Diabetic Retinopathy Vsdr Report Number. Clinical and Molecular-Genetic Insights into the Role of Oxidative Stress in Diabetic Retinopathy: Antioxidant Strategies and Future Avenues. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Nov 9;9(11):1101. doi: 10.3390/antiox9111101.

116. Saravanan PB, Vasu S, Yoshimatsu G, Darden CM, Wang X, Gu J, Lawrence MC, Naziruddin B. Differential expression and release of exosomal miRNAs by human islets under inflammatory and hypoxic stress. *Diabetologia*. 2019 Oct;62(10):1901-1914. doi: 10.1007/s00125-019-4950-x.

117. Sarthy VP, Pignataro L, Pannicke T, Weick M, Reichenbach A, Harada T, Tanaka K, Marc R. Glutamate transport by retinal Muller cells in glutamate/aspartate transporter-knockout mice. *Glia*. 2005 Jan 15;49(2):184-96. doi: 10.1002/glia.20097.

118. Sasaki Y, Ikeda Y, Miyauchi T, Uchikado Y, Akasaki Y, Ohishi M. Estrogen-SIRT1 Axis Plays a Pivotal Role in Protecting Arteries Against Menopause-Induced Senescence and Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2020 Jan 1;27(1):47-59. doi: 10.5551/jat.47993.

119. Saw M, Wong VW, Ho IV, Liew G. New anti-hyperglycaemic agents for type 2 diabetes and their effects on diabetic retinopathy. *Eye (Lond)*. 2019 Dec;33(12):1842-1851. doi: 10.1038/s41433-019-0494-z.

120. Sawant A, Ebbinghaus BN, Bleckert A, Gamlin C, Yu WQ, Berson D, Rudolph U, Sinha R, Hoon M. Organization and emergence of a mixed GABA-glycine retinal circuit that provides inhibition to mouse ON-sustained

alpha retinal ganglion cells. *Cell Rep.* 2021 Mar 16;34(11):108858. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108858.

121. Scanlon PH, Nevill CR, Stratton IM, Maruti SS, Massó-González EL, Sivaprasad S, Bailey C, Ehrlich M, Chong V. Prevalence and incidence of diabetic retinopathy (DR) in the UK population of Gloucestershire. *Acta Ophthalmol.* 2022 Mar;100(2):e560-e570. doi: 10.1111/aos.14927.

122. Schlotterer A, Kolibabka M, Lin J, Acunman K, Dietrich N, Sticht C, Fleming T, Nawroth P, Hammes HP. Methylglyoxal induces retinopathy-type lesions in the absence of hyperglycemia: studies in a rat model. *FASEB J.* 2019 Mar;33(3):4141-4153. doi: 10.1096/fj.201801146RR.

123. Scuderi S, D'amico AG, Federico C, Saccone S, Magro G, Bucolo C, Drago F, D'Agata V. Different Retinal Expression Patterns of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and Their Receptors in a Rat Model of Type 1 STZ-Induced Diabetes. *J Mol Neurosci.* 2015 Jun;56(2):431-9. doi: 10.1007/s12031-015-0505-x.

124. Seki SM, Gaultier A. Exploring Non-Metabolic Functions of Glycolytic Enzymes in Immunity. *Front Immunol.* 2017 Nov 22;8:1549. doi: 10.3389/fimmu.2017.01549.

125. Shi FJ, Xie H, Zhang CY, Qin HF, Zeng XW, Lou H, Zhang L, Xu GT, Zhang JF, Xu GX. Is Iba-1 protein expression a sensitive marker for microglia activation in experimental diabetic retinopathy? *Int J Ophthalmol.* 2021 Feb 18;14(2):200-208. doi: 10.18240/ijo.2021.02.04.

126. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells.* 2014 Jun;32(6):1380-9. doi: 10.1002/stem.1661.

127. Sieber M, Dreßler J, Franke H, Pohlers D, Ondruschka B. Post-mortem biochemistry of NSE and S100B: A supplemental tool for detecting a lethal traumatic brain injury? *J Forensic Leg Med.* 2018 Apr;55:65-73. doi: 10.1016/j.jflm.2018.02.016.

128. Simó R, Hernández C, Porta M, Bandello F, Grauslund J, Harding

SP, Aldington SJ, Egan C, Frydkjaer-Olsen U, García-Arumí J, Gibson J, Lang GE, Lattanzio R, Massin P, Midena E, Ponsati B, Ribeiro L, Scanlon P, Lobo C, Costa MÁ, Cunha-Vaz J; European Consortium for the Early Treatment of Diabetic Retinopathy (EUROCONDOR). Effects of Topically Administered Neuroprotective Drugs in Early Stages of Diabetic Retinopathy: Results of the EUROCONDOR Clinical Trial. *Diabetes*. 2019 Feb;68(2):457-463. doi: 10.2337/db18-0682.

129. Simó R, Hernández C; European Consortium for the Early Treatment of Diabetic Retinopathy (EUROCONDOR). Neurodegeneration in the diabetic eye: new insights and therapeutic perspectives. *Trends Endocrinol Metab*. 2014 Jan;25(1):23-33. doi: 10.1016/j.tem.2013.09.005.

130. Simó R, Simó-Servat O, Bogdanov P, Hernández C. Neurovascular Unit: A New Target for Treating Early Stages of Diabetic Retinopathy. *Pharmaceutics*. 2021 Aug 23;13(8):1320. doi: 10.3390/pharmaceutics13081320.

131. Simó R, Stitt AW, Gardner TW. Neurodegeneration in diabetic retinopathy: does it really matter? *Diabetologia*. 2018 Sep;61(9):1902-1912. doi: 10.1007/s00125-018-4692-1.

132. Sohn E, Kim J, Kim CS, Lee YM, Kim JS. Extract of *Polygonum cuspidatum* Attenuates Diabetic Retinopathy by Inhibiting the High-Mobility Group Box-1 (HMGB1) Signaling Pathway in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Nutrients*. 2016 Mar 3;8(3):140. doi: 10.3390/nu8030140.

133. Sohn EH, van Dijk HW, Jiao C, et al.. Retinal neurodegeneration may precede microvascular changes characteristic of diabetic retinopathy in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(19):E2655-E2664.

134. Solomon SD, Goldberg MF. ETDRS Grading of Diabetic Retinopathy: Still the Gold Standard? *Ophthalmic Res*. 2019;62(4):190-195. doi: 10.1159/000501372.

135. Somilleda-Ventura SA, Ceballos-Reyes GM, Lima-Gómez V. Comparison of macular retinal sensitivity and its contribution to the foveal



sensitivity between diabetic and non-diabetic patients with normal visual acuity. *J Optom.* 2019 Jul-Sep;12(3):180-185. doi: 10.1016/j.optom.2018.08.001.

136. Spekker-Bosker K, Ufermann CM, Oldenburg M, Däubener W, Eller SK. Interplay between IDO1 and iNOS in human retinal pigment epithelial cells. *Med Microbiol Immunol.* 2019 Dec;208(6):811-824. doi: 10.1007/s00430-019-00627-4.

137. Spencer BG, Estevez JJ, Liu E, Craig JE, Finnie JW. Pericytes, inflammation, and diabetic retinopathy. *Inflammopharmacology.* 2020 Jun;28(3):697-709. doi: 10.1007/s10787-019-00647-9.

138. Stewart EA, Samaranayake GJ, Browning AC, Hopkinson A, Amoaku WM. Comparison of choroidal and retinal endothelial cells: characteristics and response to VEGF isoforms and anti-VEGF treatments. *Exp Eye Res.* 2011 Nov;93(5):761-6. doi: 10.1016/j.exer.2011.09.010.

139. Stitt AW, Curtis TM, Chen M, Medina RJ, McKay GJ, Jenkins A, Gardiner TA, Lyons TJ, Hammes HP, Simó R, Lois N. The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res.* 2016 Mar;51:156-86. doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.08.001.

140. Stoscheck CM. Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* 1990;182:50-68.

141. Subburaj Y, Cosentino K, Axmann M, Pedrueza-Villalmanzo E, Hermann E, Bleicken S, Spatz J, García-Sáez AJ. Bax monomers form dimer units in the membrane that further self-assemble into multiple oligomeric species. *Nat Commun.* 2015 Aug 14;6:8042. doi: 10.1038/ncomms9042.

142. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, Stein C, Basit A, Chan JCN, Mbanya JC, Pavkov ME, Ramachandaran A, Wild SH, James S, Herman WH, Zhang P, Bommer C, Kuo S, Boyko EJ, Magliano DJ. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2022 Jan;183:109119. doi: 10.1016/j.diabres.2021.109119.

143. Sun Y, Rong X, Li D, Jiang Y, Lu Y, Ji Y. Down-regulation of CRTAC1 attenuates UVB-induced pyroptosis in HLECs through inhibiting ROS production. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020 Oct 29;532(1):159-165. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.07.028.

144. Sundstrom JM, Hernández C, Weber SR, Zhao Y, Dunklebarger M, Tiberti N, Laremore T, Simó-Servat O, Garcia-Ramirez M, Barber AJ, Gardner TW, Simó R. Proteomic Analysis of Early Diabetic Retinopathy Reveals Mediators of Neurodegenerative Brain Diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018 May 1;59(6):2264-2274. doi: 10.1167/iovs.17-23678.

145. Swindell WR, Johnston A, Xing X, Little A, Robichaud P, Voorhees JJ, Fisher G, Gudjonsson JE. Robust shifts in S100a9 expression with aging: a novel mechanism for chronic inflammation. *Sci Rep*. 2013;3:1215. doi: 10.1038/srep01215.

146. Szymanska M, Mahmood D, Yap TE, Cordeiro MF. Recent Advancements in the Medical Treatment of Diabetic Retinal Disease. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 31;22(17):9441. doi: 10.3390/ijms22179441.

147. Taki K, Horie T, Kida T, Mimura M, Ikeda T, Oku H. Impairment of Autophagy Causes Superoxide Formation and Caspase Activation in 661 W Cells, a Cell Line for Cone Photoreceptors, under Hyperglycemic Conditions. *Int J Mol Sci*. 2020 Jun 14;21(12):4240. doi: 10.3390/ijms21124240.

148. Taşlipinar Uzel AG, Uğurlu N, Toklu Y, Çiçek M, Boral B, Şener B, Çağil N. Relationship between stages of diabetic retinopathy and levels of brain-derived neurotrophic factor in aqueous humor and serum. *Retina*. 2020 Jan;40(1):121-125. doi: 10.1097/IAE.0000000000002355.

149. Teo ZL, Tham YC, Yu M, Chee ML, Rim TH, Cheung N, Bikbov MM, Wang YX, Tang Y, Lu Y, Wong IY, Ting DSW, Tan GSW, Jonas JB, Sabanayagam C, Wong TY, Cheng CY. Global Prevalence of Diabetic Retinopathy and Projection of Burden through 2045: Systematic Review and Meta-analysis. *Ophthalmology*. 2021 Nov;128(11):1580-1591. doi:

10.1016/j.ophtha.2021.04.027.

150. Thomas CN, Berry M, Logan A, Blanch RJ, Ahmed Z. Caspases in retinal ganglion cell death and axon regeneration. *Cell Death Discov.* 2017 Jul 3;3:17032. doi: 10.1038/cddiscovery.2017.32.

151. Tonade D, Liu H, Kern TS. Photoreceptor Cells Produce Inflammatory Mediators That Contribute to Endothelial Cell Death in Diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016 Aug 1;57(10):4264-71. doi: 10.1167/iovs.16-19859.

152. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(9):4350-4354.

153. Troy CM, Jean YY. Caspases: therapeutic targets in neurologic disease. *Neurotherapeutics.* 2015 Jan;12(1):42-8. doi: 10.1007/s13311-014-0307-9.

154. Usui Y, Westenskow PD, Murinello S, et al.. Angiogenesis and eye disease. *Annu Rev Vis Sci.* 2015;1:155-184.

155. Van de Kreeke JA, Darma S, Chan Pin Yin JMPL, Tan HS, Abramoff MD, Twisk JWR, Verbraak FD. The spatial relation of diabetic retinal neurodegeneration with diabetic retinopathy. *PLoS One.* 2020 Apr 16;15(4):e0231552. doi: 10.1371/journal.pone.0231552.

156. Van Hove I, De Groef L, Boeckx B, Modave E, Hu TT, Beets K, Etienne I, Van Bergen T, Lambrechts D, Moons L, Feyen JHM, Porcu M. Single-cell transcriptome analysis of the Akimba mouse retina reveals cell-type-specific insights into the pathobiology of diabetic retinopathy. *Diabetologia.* 2020 Oct;63(10):2235-2248. doi: 10.1007/s00125-020-05218-0.

157. Van Niekerk G, Davis T, Patterson HG, Engelbrecht AM. How Does Inflammation-Induced Hyperglycemia Cause Mitochondrial Dysfunction in Immune Cells? *Bioessays.* 2019 May;41(5):e1800260. doi: 10.1002/bies.201800260.

158. Vodianyk VV, Ziablitzev SV, Andrushchenko VI. Effect of tyrosine protein kinase blockade on the state of retinal microglia in diabetic retinopathy. *Mižnarodnij endokrinologičnij žurnal*. 2023;19(5):337-343. doi: 10.22141/2224-0721.19.5.2023.1296. in Ukrainian.

159. Völgyi B, Bloomfield SA. Axonal neurofilament-H immunolabeling in the rabbit retina. *J Comp Neurol*. 2002 Nov 18;453(3):269-79. doi: 10.1002/cne.10392.

160. Vujosevic S, Micera A, Bini S, Berton M, Esposito G, Midená E. Aqueous Humor Biomarkers of Müller Cell Activation in Diabetic Eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015 Jun;56(6):3913-8. doi: 10.1167/iovs.15-16554.

161. Wang H, Wang R, Thrimawithana T, Little PJ, Xu J, Feng ZP, Zheng W. The nerve growth factor signaling and its potential as therapeutic target for glaucoma. *Biomed Res Int*. 2014;2014:759473. doi: 10.1155/2014/759473.

162. Wang N, Wei L, Liu D, Zhang Q, Xia X, Ding L, Xiong S. Identification and Validation of Autophagy-Related Genes in Diabetic Retinopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. Apr 29;13:867600. doi: 10.3389/fendo.2022.867600.

163. Wang S, Song R, Wang Z, Jing Z, Wang S, Ma J. S100A8/A9 in Inflammation. *Front Immunol*. 2018 Jun 11;9:1298. doi: 10.3389/fimmu.2018.01298.

164. Wang T, Zhang Z, Song C, Sun L, Sui X, Qu Q, Liu J. Astragaloside IV protects retinal pigment epithelial cells from apoptosis by upregulating miR-128 expression in diabetic rats. *Int J Mol Med*. Jul;46(1):340-350. doi: 10.3892/ijmm.2020.4588.

165. Wang W, Lo ACY. Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Treatments. *Int J Mol Sci*. 2018 Jun 20;19(6):1816. doi: 10.3390/ijms19061816.

166. Whitehead M, Wickremasinghe S, Osborne A, Van Wijngaarden P, Martin KR. Diabetic retinopathy: a complex pathophysiology requiring novel therapeutic strategies. *Expert Opin Biol Ther*. 2018 Dec;18(12):1257-1270. doi:

10.1080/14712598.2018.1545836.

167. Wilkinson-Berka JL, Suphapimol V, Jerome JR, Deliyanti D, Allingham MJ. Angiotensin II and aldosterone in retinal vasculopathy and inflammation. *Exp Eye Res.* 2019 Oct;187:107766. doi: 10.1016/j.exer.2019.107766.

168. Wong TY, Cheung CM, Larsen M, Sharma S, Simó R. Diabetic retinopathy. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16012.

169. Wong TY, Sabanayagam C. Strategies to Tackle the Global Burden of Diabetic Retinopathy: From Epidemiology to Artificial Intelligence. *Ophthalmologica.* 2020;243(1):9-20. doi: 10.1159/000502387.

170. Wooff Y, Man SM, Aggio-Bruce R, Natoli R, Fernando N. IL-1 Family Members Mediate Cell Death, Inflammation and Angiogenesis in Retinal Degenerative Diseases. *Front Immunol.* 2019 Jul 16;10:1618. doi: 10.3389/fimmu.2019.01618.

171. Wu C, Xu K, Liu W, Liu A, Liang H, Li Q, Feng Z, Yang Y, Ding J, Zhang T, Liu Y, Liu X, Zuo Z. Protective Effect of Raf-1 Kinase Inhibitory Protein on Diabetic Retinal Neurodegeneration through P38-MAPK Pathway. *Curr Eye Res.* 2022 Jan;47(1):135-142. doi: 10.1080/02713683.2021.1944644.

172. 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 Dec 1;61(14):29. doi: 10.1167/iovs.61.14.29.

173. Wu W, Xie Z, Zhang Q, Ma Y, Bi X, Yang X, Li B, Chen J. Hyperoside Ameliorates Diabetic Retinopathy *via* Anti-Oxidation, Inhibiting Cell Damage and Apoptosis Induced by High Glucose. *Front Pharmacol.* 2020 May 29;11:797. doi: 10.3389/fphar.2020.00797.

174. Xia C, Braunstein Z, Toomey AC, Zhong J, Rao X. S100 Proteins As an Important Regulator of Macrophage Inflammation. *Front Immunol.* 2018 Jan 5;8:1908. doi: 10.3389/fimmu.2017.01908.

175. 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. Epub 2021 Oct 4. PMID: 34547966.

176. Xie B, Jiao Q, Cheng Y, Zhong Y, Shen X. Effect of pigment epithelium-derived factor on glutamate uptake in retinal Muller cells under high-glucose conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Feb 27;53(2):1023-32. doi: 10.1167/iovs.11-8695.

177. Xu CM, Luo YL, Li S, Li ZX, Jiang L, Zhang GX, Owusu L, Chen HL. Multifunctional neuron-specific enolase: its role in lung diseases. *Biosci Rep.* 2019 Nov 29;39(11):BSR20192732. doi: 10.1042/BSR20192732.

178. Xu D, Mu R, Wei X. The Roles of IL-1 Family Cytokines in the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Front Immunol.* 2019 Sep 13;10:2025. doi: 10.3389/fimmu.2019.02025.

179. Xu J, Chen LJ, Yu J, Wang HJ, Zhang F, Liu Q, Wu J. Involvement of Advanced Glycation End Products in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Cell Physiol Biochem.* 2018;48(2):705-717. doi: 10.1159/000491897.

180. Yang S, Zhang J, Chen L. The cells involved in the pathological process of diabetic retinopathy. *Biomed Pharmacother.* 2020b Dec;132:110818. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110818.

181. Yashima H, Terasaki M, Sotokawauchi A, Matsui T, Mori Y, Saito T, Osaka N, Kushima H, Hiromura M, Ohara M, Fukui T, Yamagishi SI. AGE-RAGE Axis Stimulates Oxidized LDL Uptake into Macrophages through Cyclin-Dependent Kinase 5-CD36 Pathway via Oxidative Stress Generation. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 4;21(23):9263. doi: 10.3390/ijms21239263.

182. Yenihayat F, Özkan B, Kasap M, Karabaş VL, Güzel N, Akpınar G, Pirhan D. Vitreous IL-8 and VEGF levels in diabetic macular edema with or without subretinal fluid. *Int Ophthalmol.* 2019 Apr;39(4):821-828. doi:

10.1007/s10792-018-0874-6.

183. Yu YY, Liu QP, Li MT, An P, Chen YY, Luan X, Lv C, Zhang H. Hu-Zhang-Qing-Mai-Yin Inhibits Proliferation of Human Retinal Capillary Endothelial Cells Exposed to High Glucose. *Front Pharmacol*. 2021 Aug 6;12:732655. doi: 10.3389/fphar.2021.732655.

184. Yu ZW, Liu R, Li X, Wang Y, Fu YH, Li HY, Yuan Y, Gao XY. High Serum Neuron-Specific Enolase Level Is Associated with Mild Cognitive Impairment in Patients with Diabetic Retinopathy. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020 Apr 24;13:1359-1365. doi: 10.2147/DMSO.S249126.

185. Yuan A, Nixon RA. Neurofilament Proteins as Biomarkers to Monitor Neurological Diseases and the Efficacy of Therapies. *Front Neurosci*. 2021 Sep 27;15:689938. doi: 10.3389/fnins.2021.689938.

186. Yuan A, Rao MV, Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017 Apr 3;9(4):a018309. doi: 10.1101/cshperspect.a018309.

187. Zhao H, Kong H, Wang B, Wu S, Chen T, Cui Y. RNA-Binding Proteins and Alternative Splicing Genes Are Coregulated in Human Retinal Endothelial Cells Treated with High Glucose. *J Diabetes Res*. 2022a Mar 9;2022:7680513. doi: 10.1155/2022/7680513

188. Zhao X, Ling F, Zhang GW, Yu N, Yang J, Xin XY. The Correlation Between MicroRNAs and Diabetic Retinopathy. *Front Immunol*. 2022b Jul 25;13:941982. doi: 10.3389/fimmu.2022.941982.

189. Zhu Y, Hu J, Du X, Fang Q, Zhou Y, Chen K. Correlation of serum delta-like ligand-4 level with the severity of diabetic retinopathy. *BMC Endocr Disord*. 2021 Aug 6;21(1):157. doi: 10.1186/s12902-021-00814-6.

190. Ziablitsev SV, Starodubskaya OO, Bogza SL. Influence of carbacetam on neurologic destruction processes under the experimental traumatic brain injury. *Journal of Education, Health and Sport formerly of Health Sciences*. 2017;7(2):601-611. <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.583749>.

191. Ziablitsev SV, Vodianyuk VV. Retinal apoptosis and the effect of tyrosine kinase inhibition in experimental diabetes. *Journal of Ophthalmology (Ukraine)*. 2023;5(514):34-40. doi: 10.31288/oftalmolzh202353440.

192. Ziablitsev SV, Zhupan DB, Tykhomyrov AO, Dyadyk OO. Benzodiazepine receptor agonist Carbacetam modulates the level of vascular endothelial growth factor in the retina of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Ukr Biochem J*. 2023.;6(95):21-29. <https://doi.org/10.15407/ubj95.06.021>.

193. Ziablitsev SV, Zhupan DB. The state of S100-positive glia and the effect on it on the GABA-benzodiazepine receptor agonist, carbacetam, in diabetic retinopathy. *Journal of Ophthalmology (Ukraine)*. 2024;3(518):33-39. <https://doi.org/10.31288/oftalmolzh202433339>

194. Ziablitsev SV, Zhupan DB, Dyadyk OO. The influence of a benzodiazepine receptor agonist on the state of glia in the diabetic retinopathy. *Fiziol. Zh.* 2023; 69(6): 33-42. <https://doi.org/10.15407/fz69.06.033>. in Ukrainian.



## ДОДАТКИ

### Додаток № 1. Акти впровадження результатів роботи в науковий обіг та практичну діяльність

«ЗАТВЕРДЖУЮ»  
Проректор закладу вищої освіти з науково-педагогічної роботи Івано-Франківського національного медичного університету МОЗ України

д. мед. н., професор С. В. ЗЯБЛИЦЕВ  
..12.. вересня 2024



#### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва впровадження:** Механізми розвитку нейроденеграції та обґрунтування її корекції при діабетичному ураженні сітківки.
2. **Установа-розробник, автор:** Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, асп. кафедри патофізіології Жупан Д.Б.
3. **Джерело інформації:**
  1. Зяблицев СВ, Жупан Д.Б, Дядик ОО. Вплив бензодіазепінових рецепторів на стан глії при розвитку діабетичної ретинопатії. Фізіологічний журнал. 2023; 69(6):33-42.
  2. Ziablitsev SV, Zhupan DB, Tykhomyrov AO, Dyadyk OO. Benzodiazepine receptor agonist Carbacetam modulates the level of vascular endothelial growth factor in the retina of rats with streptozotocin-induced diabetes. Ukr Biochem J. 2023.;6(95):21-29.
  3. Ziablitsev SV, Zhupan DB. The state of S100-positive glia and the effect on it on the GABA-benzodiazepine receptor agonist, carbacetam, in diabetic retinopathy. Journal of Ophthalmology (Ukraine). 2024;3(518):33-39.
4. **Де впроваджено:** На кафедрі патофізіології Івано-Франківського національного медичного університету при проведенні лекційного курсу та практичних занять за темами «Порушення вуглеводного обміну», «Патологічна фізіологія нервової та ендокринної систем».
5. **Терміни впровадження:** 2023-2024 навчальний рік.
6. **Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень асп. Жупан Д.Б. в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів про механізми діабетичної ретинопатії та напрямки її патогенетичної корекції.
7. **Зауваження та пропозиції:** Немає.
8. **Затверджено** на засіданні кафедри «09» вересня 2024 р. протокол №3.

#### Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри патофізіології  
Івано-Франківського національного  
медичного університету МОЗ України,  
заслужений діяч науки і техніки України,  
д.мед.н., професор

  
Любомир ЗЛЯЦЬ

## Продовження додатку 1

## «ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор закладу вищої освіти з науково-педагогічної роботи

Одеського національного медичного університету,

Костянтин ТАЛАЛАЄВ

« 19 » вересня 2024 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва впровадження:** Механізми розвитку нейродегенерації та обґрунтування її корекції при діабетичному ураженні сітківки.
2. **Установа-розробник, автор:** Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, аспірантка кафедри патофізіології Жупан Д.Б.
3. **Джерела інформації:**
  1. Зябліцев СВ, Жупан Д.Б, Дядик ОО. Вплив бензодіазепінових рецепторів на стан глії при розвитку діабетичної ретинопатії. Фізіологічний журнал. 2023; 69(6):33-42. <https://doi.org/10.15407/fz69.06.033>.
  2. Ziablitsev SV, Zhupan DB, Tykhomyrov AO, Dyadyk OO. Benzodiazepine receptor agonist Carbacetam modulates the level of vascular endothelial growth factor in the retina of rats with streptozotocin-induced diabetes. Ukr Biochem J. 2023.;6(95):21-29. <https://doi.org/10.15407/ubj95.06.021>.
  3. Ziablitsev SV, Zhupan DB. The state of S100-positive glia and the effect on it on the GABA-benzodiazepine receptor agonist, carbacetam, in diabetic retinopathy. Journal of Ophthalmology (Ukraine). 2024;3(518):33-39. <https://doi.org/10.31288/oftalmolzh202433339>.
4. **Де впроваджено:** На кафедрі загальної та клінічної патологічної фізіології імені В.В. Підвисоцького Одеського національного медичного університету МОЗ України при проведенні лекційного курсу та практичних занять за темами «Порушення обміну речовин, цукровий діабет» та «Патофізіологія ендокринної системи».
5. **Терміни впровадження:** 2023-2024 навчальний рік.
6. **Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень асп. Жупан Д.Б. в навчальному процесі доповнює учбову програму з питання патогенезу діабетичної ретинопатії та її лікування.
7. **Зауваження та пропозиції:** Немає.
8. **Затверджено** на засіданні кафедри загальної та клінічної патологічної фізіології ім. В.В. Підвисоцького від 27 серпня 2024 р, протокол №1.

**Відповідальний за впровадження:**

Завідувач кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. В.В. Підвисоцького Одеського національного медичного університету МОЗ України, Заслужений діяч науки і техніки України, д.мед.н., професор

Руслан ВАСТЬЯНОВ

## Продовження додатку 1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор з науково-педагогічної  
роботи Полтавського державного  
медичного університету

д.мед.н., професор

Валентин Дворник

«03» жовтня 2024 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- Назва впровадження:** Механізми розвитку нейродегенерації та обґрунтування її корекції при діабетичному ураженні сітківки.
- Установа-розробник, автор:** Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, аспірантка кафедри патофізіології Жупан Д.Б.

## 3. Джерело інформації:

- Зябліцев СВ, Жупан Д.Б, Дядик ОО. Вплив бензодіазепінових рецепторів на стан глії при розвитку діабетичної ретинопатії. Фізіологічний журнал. 2023; 69(6):33-42. <https://doi.org/10.15407/fz69.06.033>.
- Ziablitsev SV, Zhupan DB, Tykhomyrov AO, Dyadyk OO. Benzodiazepine receptor agonist Carbacetam modulates the level of vascular endothelial growth factor in the retina of rats with streptozotocin-induced diabetes. Ukr Biochem J. 2023.;6(95):21-29. <https://doi.org/10.15407/ubj95.06.021>.
- Ziablitsev SV, Zhupan DB. The state of S100-positive glia and the effect on it on the GABA-benzodiazepine receptor agonist, carbacetam, in diabetic retinopathy. Journal of Ophthalmology (Ukraine). 2024;3(518):33-39. <https://doi.org/10.31288/oftalmolzh202433339>.

**Де впроваджено:** На кафедрі патофізіології Полтавського державного медичного університету при проведенні лекційного курсу та практичних занять за темами «Порушення вуглеводного обміну», «Патофізіологія нервової та ендокринної систем».

4. **Терміни впровадження:** 2023-2024 навчальний рік.

5. **Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень асп. Жупан Д.Б. в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів про механізми діабетичної ретинопатії та напрямки патогенетичної корекції.

6. **Зауваження та пропозиції:** Немає.

7. **Затверджено** на засіданні кафедри 17 вересня 2024 р., протокол №3.

**Відповідальний за впровадження:**

Завідувач кафедри патофізіології  
Полтавського державного  
медичного університету,  
д.мед.н., професор



Віталій Костенко

## Продовження додатку 1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор Навчально-наукового медичного  
інституту Сумського державного  
університету  
д.мед.н., професор А.М. Лобода



« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва впровадження:** Механізми розвитку нейроденегерації та обґрунтування її корекції при діабетичному ураженні сітківки.
2. **Установа-розробник, автор:** Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, асп. кафедри патофізіології Жупан Д.Б.
3. **Джерело інформації:**
  1. Зяблицев СВ, Жупан Д.Б, Дядик ОО. Вплив бензодіазепінових рецепторів на стан глії при розвитку діабетичної ретинопатії. Фізіологічний журнал. 2023; 69(6):33-42. <https://doi.org/10.15407/fz69.06.033>.
  2. Ziablitsev SV, Zhupan DB, Tykhomyrov AO, Dyadyk OO. Benzodiazepine receptor agonist Carbacetam modulates the level of vascular endothelial growth factor in the retina of rats with streptozotocin-induced diabetes. Ukr Biochem J. 2023.;6(95):21-29. <https://doi.org/10.15407/ubj95.06.021>.
4. **Де впроваджено:** На кафедрі фізіології і патофізіології з курсом медичної біології ННМІ СумДУ при проведенні лекційного курсу та практичних занять за темою «Патологічна фізіологія нервової та ендокринної систем», «Патофізіологія екстремальних станів».
5. **Терміни впровадження:** 2023-2024 навчальний рік.
6. **Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень асп. Жупан Д.Б. в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів про механізми діабетичної ретинопатії та напрямки патогенетичної корекції.
7. **Зауваження та пропозиції:** Немає.
8. **Затверджено** на засіданні кафедри «24» вересня 2024 р., протокол № 3.

**Відповідальна за впровадження:**

Завідувачка кафедри фізіології і патофізіології  
з курсом медичної біології  
ННМІ СумДУ  
д.біол.н., професор

В.Ю. Гарбузова

## Продовження додатку 1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор закладу вищої освіти з наукової роботи Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України  
д.біол.н., професор І.М. Кліш

« 25 » вересня 2024 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва впровадження:** Механізми розвитку нейродегенерації та обґрунтування її корекції при діабетичному ураженні сітківки.
2. **Установа-розробник, автор:** Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, аспірантка кафедри патофізіології Жупан Д.Б.
3. **Джерело інформації:** 1. Зябліцев СВ, Жупан Д.Б, Дядик ОО. Вплив бензодіазепінових рецепторів на стан глії при розвитку діабетичної ретинопатії. Фізіологічний журнал. 2023; 69(6):33-42. <https://doi.org/10.15407/fz69.06.033>.  
2. Ziablitsev SV, Zhupan DB, Tykhomyrov AO, Dyadyk OO. Benzodiazepine receptor agonist Carbacetam modulates the level of vascular endothelial growth factor in the retina of rats with streptozotocin-induced diabetes. Ukr Biochem J. 2023.;6(95):21-29. <https://doi.org/10.15407/ubj95.06.021>.  
3. Ziablitsev SV, Zhupan DB. The state of S100-positive glia and the effect on it on the GABA-benzodiazepine receptor agonist, carbacetam, in diabetic retinopathy. Journal of Ophthalmology (Ukraine). 2024;3(518):33-39. <https://doi.org/10.31288/oftalmolzh202433339>.
4. **Де впроваджено:** На кафедрі патологічної фізіології Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України при проведенні лекційного курсу та практичних занять за темами «Порушення вуглеводного обміну», «Патологічна фізіологія нервової системи», «Патологічна фізіологія ендокринної системи».
5. **Терміни впровадження:** 2023-2024 навчальний рік.
6. **Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень асп. Жупан Д.Б. в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів про механізми діабетичної ретинопатії та напрямки патогенетичної корекції.
7. **Зауваження та пропозиції:** Немає.
8. **Затверджено** на засіданні кафедри « 25 » вересня 2024 р., протокол № 9

#### Відповідальний за впровадження:

Завідувачка кафедри патологічної фізіології  
Тернопільського національного медичного університету імені І.Я.  
Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України,  
д.мед.н., професор



О.В. Денефіль

## Продовження додатку 1

**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**

Проректор з адміністративної освіти з  
науково-педагогічної роботи  
Буковинського державного  
медичного університету  
доцент *Золотий Мир ХОДОРОВСЬКИЙ*  
«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 р.



### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Механізми розвитку нейродегенерації та обґрунтування її корекції при діабетичному ураженні сітківки.
2. **Ким запропонована, адреса, виконавець:** Національний медичний університет імені О.О.Богомольця, аспірантка кафедри патофізіології Жупан Д.Б.
3. **Джерела інформації:**
  1. Зябліцев СВ, Жупан Д.Б, Дядик ОО. Вплив бензодіазепінових рецепторів на стан глії при розвитку діабетичної ретинопатії. Фізіологічний журнал. 2023; 69(6):33-42.
  2. Ziablitsev SV, Zhupan DB, Tykhomyrov AO, Dyadyk OO. Benzodiazepine receptor agonist Carbacetam modulates the level of vascular endothelial growth factor in the retina of rats with streptozotocin-induced diabetes. Ukr Biochem J. 2023.;6(95):21-29.
  3. Ziablitsev SV, Zhupan DB. The state of S100-positive glia and the effect on it on the GABA-benzodiazepine receptor agonist, carbacetam, in diabetic retinopathy. Journal of Ophthalmology (Ukraine). 2024;3(518):33-39.
4. **Впроваджено:** кафедра патологічної фізіології Буковинського державного медичного університету.
5. **Термін впровадження:** 2023-2024 н.р.
6. **Форма впровадження:** впроваджено у навчальний процес – у матеріал лекцій і практичних занять для студентів, аспірантів і здобувачів.
7. **Ефективність впровадження:** Використання результатів наукових досліджень асп. Жупан Д.Б. в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів про механізми діабетичної ретинопатії та напрямки патогенетичної корекції.

### Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри патологічної фізіології  
Буковинського державного медичного  
університету, д.мед.н., професор



Юрій РОГОВИЙ

## Продовження додатку 1

**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**  
 Проректор з наукової роботи  
 Львівського медичного університету  
 д.мед.н., професор Юрій ФЕДОРОВ



\_\_\_\_\_ 2024 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. **Назва впровадження:** Механізми розвитку нейродегенерації та обґрунтування її корекції при діабетичному ураженні сітківки.
2. **Установа-розробник, автор:** Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, аспірантка кафедри патофізіології Жупан Д.Б.
3. **Джерело інформації:**
  1. Зябліцев СВ, Жупан Д.Б, Дядик ОО. Вплив бензодіазепінових рецепторів на стан глії при розвитку діабетичної ретинопатії. Фізіологічний журнал. 2023; 69(6):33-42. <https://doi.org/10.15407/fz69.06.033>.
  2. Ziablitsev SV, Zhupan DB, Tykhomyrov AO, Dyadyk OO. Benzodiazepine receptor agonist Carbacetam modulates the level of vascular endothelial growth factor in the retina of rats with streptozotocin-induced diabetes. Ukr Biochem J. 2023.;6(95):21-29. <https://doi.org/10.15407/ubj95.06.021>.
4. **Де впроваджено:** На кафедрі патологічної фізіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького при проведенні лекційного курсу та практичних занять за темами «порушення вуглеводного обміну», «патологічна фізіологія нервової та ендокринної систем».
5. **Терміни впровадження:** 2023-2024 навчальний рік.
6. **Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень асп. Жупан Д.Б. в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів про механізми діабетичної ретинопатії та напрямки патогенетичної корекції.
7. **Зауваження та пропозиції:** Немає.
8. **Затверджено** на засіданні кафедри «2» жовтня 2024 р., протокол № 3.

**Відповідальний за впровадження:**

Завідувачка кафедри анатомії, фізіології та патології  
 Львівського медичного університету,  
 к.мед.н., професор



Ольга РЯБУХА

## Продовження додатку 1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної  
роботи Харківського національного  
медичного університету  
доц. І.В. Лещина

« 26 »  2024 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва впровадження:** Механізми розвитку нейроденегації та обґрунтування її корекції при діабетичному ураженні сітківки.
2. **Установа-розробник, автор:** Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, асп. кафедри патофізіології Жупан Д.Б.
3. **Джерела інформації:**
  1. Зябліцев СВ, Жупан Д.Б., Дядик ОО. Вплив бензодіазепінових рецепторів на стан глії при розвитку діабетичної ретинопатії. Фізіологічний журнал. 2023; 69(6):33-42. <https://doi.org/10.15407/fz69.06.033>.
  2. Ziablitsev SV, Zhupan DB. The state of S100-positive glia and the effect on it on the GABA-benzodiazepine receptor agonist, carbacetam, in diabetic retinopathy. Journal of Ophthalmology (Ukraine). 2024;3(518):33-39. <https://doi.org/10.31288/oftalmolzh202433339>
4. **Де впроваджено:** На кафедрі загальної та клінічної патологічної фізіології імені Д.О. Альперна Харківського національного медичного університету при проведенні лекційного курсу та практичних занять за темами «Порушення обміну речовин, цукровий діабет» та «Патофізіологія ендокринної системи».
5. **Терміни впровадження:** 2023-2024 навчальний рік.
6. **Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень асп. Жупан Д.Б. в навчальному процесі доповнює учбову програму з питання патогенезу діабетичної ретинопатії та її лікування.
7. **Зауваження та пропозиції:** Немає.
8. **Затверджено** на засіданні кафедри від 17.09.2024 р., протокол № 4.

## Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри загальної та клінічної  
патологічної фізіології імені Д.О. Альперна  
Харківського національного  
медичного університету,  
д.мед.н., професор

 Михайло МИРОШНИЧЕНКО



**Додаток № 2. Список публікацій здобувача за темою дисертації**

*Наукові праці, в яких опубліковані основні результати дисертації:*

1. Зябліцев СВ, Жупан Д.Б, Дядик ОО. Вплив бензодіазепінових рецепторів на стан глії при розвитку діабетичної ретинопатії. Фізіологічний журнал. 2023; 69(6):33-42. <https://doi.org/10.15407/fz69.06.033>.

2. Ziablitsev SV, Zhupan DB, Tykhomyrov AO, Dyadyk OO. Benzodiazepine receptor agonist Carbacetam modulates the level of vascular endothelial growth factor in the retina of rats with streptozotocin-induced diabetes. Ukr Biochem J. 2023.;6(95):21-29. <https://doi.org/10.15407/ubj95.06.021>.

3. Ziablitsev SV, Zhupan DB. The state of S100-positive glia and the effect on it on the GABA-benzodiazepine receptor agonist, carbacetam, in diabetic retinopathy. Journal of Ophthalmology (Ukraine). 2024;3(518):33-39. <https://doi.org/10.31288/oftalmolzh202433339>.

4. Зябліцев СВ, Жупан ДБ. Експресія нейрон-специфічної енолази в сітківці та вплив на неї агоніста бензодіазепінових рецепторів карбацетаму при експериментальній діабетичній ретинопатії. Архів офтальмології України. 2024;12(1):9-15. <https://doi.org/10.22141/2309-8147.12.1.2024.350>.

5. Жупан ДБ. Експресія нейрофіламентів у сітківці при експериментальній діабетичній ретинопатії та вплив агоністу бензодіазепінових рецепторів карбацетаму. Медична наука України. 2024;20(1):80-88. <https://doi.org/10.32345/2664-4738.1.2024.11>.

*Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:*

6. Зябліцев СВ, Жупан ДБ. Експресія гліального фібрилярного протеїну (GFAP) у сітківки при експериментальному стрептозотоциновому діабеті. В кн.: Бюллетень мат-лів наук. конф. XXII читання ім. В.В. Підвисоцького (18-19 травня 2023 р.). Одеса: УкрНДІ медицини транспорту, 2023:81-82.

7. Жупан ДБ. Ретинальна експресія васкулоендотеліального фактора росту у тканинах сітківки при експериментальній діабетичній ретинопатії та вплив агоніста бензодіазепінових рецепторів карбацетаму. Мат-ли VI науково-практичної internet-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція», м. Харків, 16 листопада 2023 р., 2023:201.

8. Жупан ДБ, Зябліцев СВ. Ефект агоністу бензодіазепінових рецепторів карбацетаму на експресію нейрофіламентів у сітківці при експериментальному цукровому діабеті. Зб. наук. праць за матеріалами ХХ Всеукраїнської наукової конференції «Актуальні питання біології та медицини», м. Лубни, 24 травня 2024 р. Лубни. Вид-во ДЗ «ЛНУ імені Тараса Шевченка». 2024:79-81.

9. Жупан ДБ, Зябліцев СВ, Заріцька ОО., Бабенко МС. Гліальні реакції при розвитку ранньої діабетичної ретинопатії та вплив агоністу ГАМК-бензодіазепінових рецепторів карбацетаму. В кн.: Бюлетень мат-лів наук. конф. ХХІІІ читання В.В. Підвисоцького (16-17 травня 2024 р.). Одеса: УкрНДІ медицини транспорту. 2024:52-54.

10. Зябліцев СВ, Жупан ДБ, Бабенко МС. Реакція глії при розвитку діабетичної ретинопатії та вплив агоністу бензодіазепінових рецепторів карбацетаму. Мат-ли ІХ Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю «Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України», присвяченого 100-річчю Української патологічної фізіології. 19-21 вересня 2024 р., Івано-Франківськ, 2024. Одеса: Сімекс Прінт. 2024:99-100.