

ЕКСПРЕСІЯ ІОНІЗОВАНОЇ КАЛЬЦІЙ-ЗВ'ЯЗУВАЛЬНОЇ АДАПТОРНОЇ МОЛЕКУЛИ-1 (Iba-1) І CD68 ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ДІАБЕТИЧНІЙ РЕТИНОПАТІЇ ТА ВПЛИВ НЕЇ БЛОКАДИ КЛІТИННИХ ПРОТЕЇНКІНАЗ

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

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

usenko1205@gmail.com

Актуальність. У розвитку діабетичної ретинопатії (ДР) важлива роль належить сигнальним шляхам клітинних протеїнкіназ, що реалізують ефекти зовнішніх факторів. Їх блокада є обґрунтованим заходом попередження розвитку ДР, що, ймовірно, може реалізуватися через гальмування прозапальної ролі мікроглії сітківки.

Ціль: дослідження стану мікроглії сітківки за вмістом Iba-1 і експресією CD68 при експериментальній ДР та впливу застосування блокатора клітинних протеїнкіназ сорафенібу.

Матеріали та методи. У щурів-самців лінії Wistar моделювали ДР шляхом одноразового введення стрептозоточину (50 мг/кг; Sigma-Aldrich, Co, China). Щурів було розподілено на 3 групи: контрольна, з введенням інсуліну (30 Од; NovoNordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark) і з введенням інсуліну і сорафенібу (50 мг/кг; Cipla, India). Імуногістохімічне дослідження проводили з використанням моноклональних антитіл проти CD68 (Clone KP-1, Master Diagnostica, Spain). Визначення вмісту Iba-1 у лізатах тканини сітківки проводили методом імуноблотингу (Invitrogen, США).

Результати. Через 7 діб після введення стрептозоточину CD68-позитивне забарвлення було відмічено навколо судин у хоріоїдальному сплетінні, по ходу судин вздовж внутрішньої поверхні сітківки та біля судин внутрішнього плексiformного шару. Кількість забарвлених елементів та інтенсивність забарвлення через 28 діб збільшувалися, а через 3 місяці з'являлася численна популяція поодиноких CD68-позитивних клітин у внутрішніх шарах сітківки. Застосування інсуліну з сорафенібом суттєво зменшувало CD68-позитивне забарвлення сітківки. Методом імунолотингу Iba-1 не був виявлений у тканинах сітківки інтактних щурів, але за умов ДР його експресія була на високому рівні. При лікуванні інсуліном виявлялися слідові концентрації Iba-1, тоді як при застосуванні інсуліну з сорафенібом маркер не виявлявся.

Висновок. Показано зменшення у діабетичній сітківці вмісту Iba-1 і експресії CD68 під впливом сорафенібу, що вказувало на гальмування ранньої активації мікроглії і резидентних моноцитів при гіперглікемії.

Ключові слова: діабетична ретинопатія, мікроглія, Iba-1, CD68, сорафеніб.

Актуальність. Багато клінічних та експериментальних досліджень діабетичної ретинопатії (ДР) при цукровому діабеті (ЦД) зосереджені на судинній дисфункції сітківки (пошкодження ендотеліальних клітин, перичитів, потовщення капілярної базальної мембрани із збільшенням її проникності, інтраретинальні судинні аномалії, мікроаневризми, тощо) [1, 2]. Більш того, сучасна діагностика стадій ДР заснована на клінічно видимих мі-

кросудинних змінах сітківки, але не включає оцінку нейродегенеративних уражень, які можуть виникати ще до появи діабетичної васкулопатії [3, 4].

Основною причиною погіршення чи втрати зору є деградація нервових елементів сітківки, що разом із мікросудинами утворюють єдину нейроваскулярну одиницю [5]. До її складу входять гангліонарні нейрони, біполярні і горизонтальні клітини, астроцити, клітини Мю-

ллера, мікроглія, перицити та ендотеліальні клітини, які у своїй взаємодії регулюють обіг крові у внутрішніх шарах сітківки [6, 7]. У цій клітинній ієрархії треба виокремити важливий механізм первинної реакції на метаболічні порушення при гіперглікемії – активацію мікроглії, що супроводжується гіперпродукцією різних цитокінів, факторів росту, матриксних металопротеїназ та інших прозапальних чинників [8, 9].

Показано, що при гіперглікемії під впливом білкових продуктів глікації мікроглія, як і резидентні макрофагі, активуються, мігрують в глибокі шари сітківки; мікроглія набуває амебоїдної форми та здатності до фагоцитозу [10]. Ці зміни супроводжуються збільшенням утворення мікроглією фактору некрозу пухлин (TNF- α) і васкулоендотеліального фактора росту (VEGF). Маркерами, що дозволяють ідентифікувати та оцінити стан мікроглії є іонізована кальцій-зв'язуюча адапторна молекула-1 (Iba-1) і CD68 [11]. При цьому перший є універсальним структурним маркером мікроглії ЦНС ссавців, тоді як CD68 експресується мікроглією при її активації. Iba-1 є цитозольним протеїном з молекулярною масою 17 кДа і є маркером мікроглії і макрофагів [12]. CD68 є лізосомальним маркером активованих мікроглії, а також нейтрофілів та моноцитів [13].

Клітинним механізмом, за допомогою якого G-білки при ДР індукують запалення через матричну металопротеїназу-9 (MMP-9), є активація сигнального каскаду внутрішньоклітинних протеїнкіназ (H-Ras, Raf-1, MEK і ERK) [14]. Каскад Ras/Raf-1/MEK/ERK відіграє важливу роль в активації MMP-9 сітківки, що призводить до апоптозу капілярних клітин. Клітини Мюллера в культурі під впливом високого вмісту глюкози демонстрували посилений апоптоз, що знижувалося при застосуванні білка, що інгібує кіназу Raf-1, що також знижувало діабетичну нейродегенерацію сітківки у щурів зі стрептозотоциновою моделлю цукрового діабету [15]. При цьому гіперглікемія посилювала імунореактивність p38-MAPK, а також експресію білка p38-MAPK і каспази-3. Полікомпонентне пригнічення сигнального шляху P38 та ядерного фактору капа В-лімфоцитів (NF- κ B)

пригнічувало проліферацію та сприяло пов'язаному з мітохондріями апоптозу ендотеліальних клітин капілярів сітківки людини, які піддавалися впливу високого рівня глюкози [16].

Ці дані підтверджували роль молекулярних механізмів залучення сигнальних шляхів клітинних протеїнкіназ у механізми ДР. Їх блокада є обґрунтованим заходом попередження розвитку ДР, що, можливо, може реалізуватися й через гальмування прозапальної ролі мікроглії сітківки. Мультикіназний блокатор клітинних протеїнкіназ сорафеніб значно зменшував спричинену світлом гіперекспресію VEGF та інших факторів росту в культурі первинних астроцитів головки зорового нерва людини, що вказувало на його потенціал як лікувального засобу неоваскуляризації сітківки [17].

Ціль: роботи полягала у дослідженні стану мікроглії сітківки за вмістом Iba-1 і експресією CD68 при експериментальній ДР та впливу застосування блокатора клітинних протеїнкіназ сорафенібу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

При виконанні роботи керувалися нормами та принципами Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986), Директиви Ради Європи 86/609/EEC (1986), Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (2001).

До дослідження залучено 50 трьохмісячних щурів-самців лінії Wistar вагою 140-160 г. Експериментальний ЦД моделювали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину (50 мг/кг; Sigma-Aldrich, Co, China), розчиненого у холодному 0,1 М цитратному буфері (pH4,5). Кожні три доби контролювали рівень глікемії за допомогою глюкометра та одноразових тест-смужок (ACCU-Chek Instant, Roche, Mannheim, Germany) у крові, забраної з хвостової вени натще. Через 3 доби після ін'єкції вміст глюкози

у крові тварин, яким вводили стрептозотоцин був не менше 15 ммоль/л. Тварин спостерігали протягом 3 місяців.

Через 7 діб тварин зі стійкою гіперглікемією сліпим випадком способом розділили на 3 групи по 15 особин. У 1-й групі (контроль) лікування гіперглікемії не проводили. У 2-й групі тваринам через день внутрішньочеревино вводили інсулін короткої дії (Actrapid HM Penfill, Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark) у дозі 30 Од. Тваринам 3-ї групи вводили інсулін (по схемі 2-ї групи), а також *per os* щоденно вводили розчин інгібітору протеїнінази сорафенібу (200 мг, Cipla, Індія) у дозі 50 мг/кг у вигляді соше. Також було використано 5 інтактних тварин для отримання початкових даних.

Тварин виводили з експерименту через 7 і 28 діб та через 3 місяці у кількості по 5 особин в кожній групі шляхом смертельної ін'єкції тіопенталу (75 мг/кг). Для морфологічних досліджень очі занурювали у 10% розчин нейтрального формаліну та заливали в парафін. З парафінових блоків на ротаційному мікротомі HM 325 ("Thermo Shandon", Англія) виготовляли серійні гістологічні зрізи товщиною 2–3 мкм. Імуногістохімічне дослідження проводили з використанням моноклональних мишиних антитіл до CD68 (Clone KP-1, Master Diagnostica, Spain). Зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном. Мікроскопічне дослідження та фотоархівування проводили із використанням світлооптичних мікроскопів "ZEISS" (Німеччина) з системою обробки результатів "Axio Imager. A2".

Визначення вмісту Iba-1 у лізатах тканини сітківки проводили методом імуноблотингу. Зразки тканини витримували у скрапленому азоті, подрібнювали та гомогенізували. Електрофорез проводили у 8%-му поліакриламідному гелі у камері для вертикального гель-електрофорезу ("BioRad", США). Протеїни з гелю переносили на нітроцелюлозну мембрану за допомогою електроблоту. Мембрани інкубували з моноклональними антитілами до Iba-1 (no. MA5-27726, mouse, 1:1,500 diluted; Invitrogen, США). Антитіла до актину (β -actin (loading control), no. MA5-15739, mouse, 1:3,000, Invitrogen, USA) використовували для його де-

текції як контролю нанесення протеїну. Після первинної інкубації мембрани відмивали та обробляли антивидовими вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому (goat anti-rabbit or anti-mouse IgG, Invitrogen, USA, cat. nos. G-21234 and 31430, respectively, 1:8,000 diluted). Напівкількісний аналіз проводили денситометрично, використовуючи програмне забезпечення TotalLab (TL120, "Nonlinear Inc", США). Результати імуноблот-аналізу вмісту виражали в умовних одиницях (ум. од.) від контрольної величини оптичної густини відповідної поліпептидної зони на блотограмах, нормованої за вмістом актину в кожному зразку.

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

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Імуногістохімічне виявлення CD68 при ДР показало наявність специфічного забарвлення у сітківці (рис. 1).

Через 7 діб імунопозитивне забарвлення було відмічено навколо судин у хоріоїдальному сплетінні (див. рис. 1a, b). Також окремі поодинокі CD68-позитивні клітини виявлялися по ходу судин вздовж внутрішньої поверхні сітківки та біля судин внутрішнього плексіформного шару. Кількість забарвлених елементів та інтенсивність забарвлення через 28 діб збільшувалися (див. рис. 1c, d), що могло свідчити про активний рекрутинг циркулюючих моноцитів у сітківку внаслідок розвитку метаболічного запалення [18]. При цьому була відмічена ектазія судин сітківки.

Через 3 місяці (див. рис. 1e, f) у тканинах сітківки з'являлася досить численна популяція поодиноких CD68-позитивних клітин, що переважно виявлялися у внутрішніх шарах сітківки. За морфологією вони відповідали активованій мікроглії, яка набуває здатності до міграції і фагоцитозу [19].

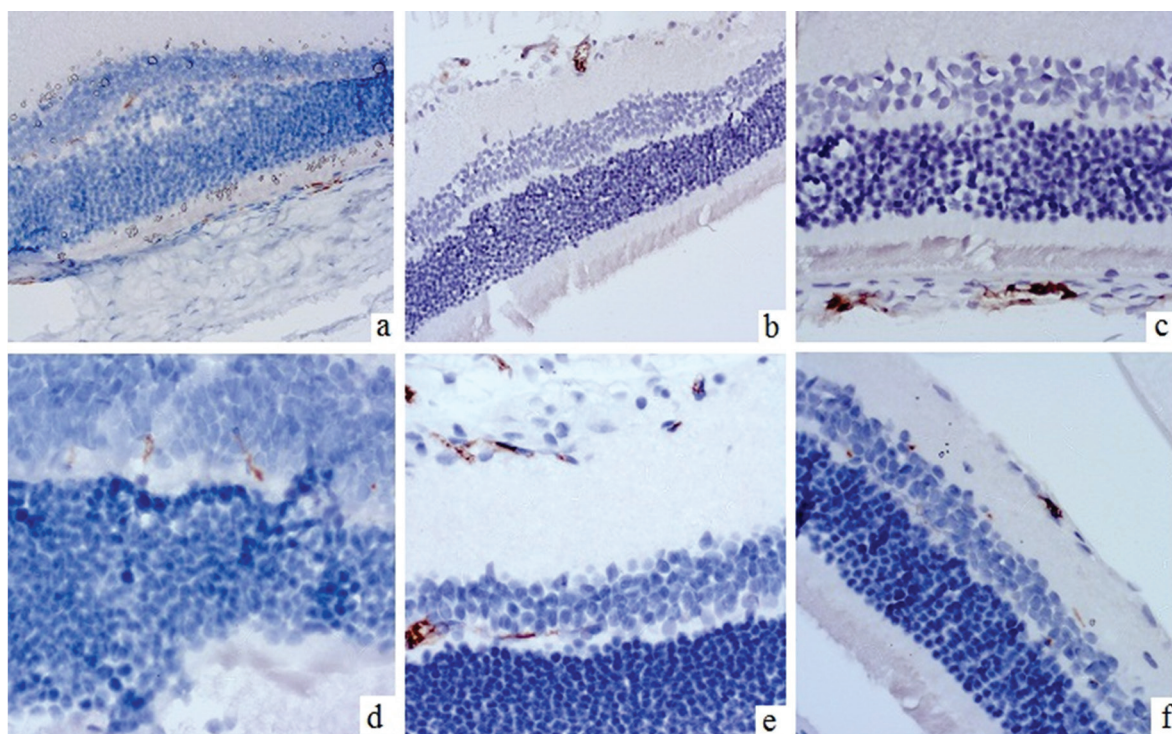


Рис. 1. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження CD68 у сітківці щурів при діабетичній ретинопатії; а, b $\times 200$; c-f $\times 400$; дозабарвлення гематоксиліном; а, b – через 7 діб; c, d – через 28 діб; e, f – через 3 місяці.

При застосуванні інсуліну з сорафенібом CD68-позитивне забарвлення відповідало такому на початку дослідження, що свідчило про попередження розвитку запалення у сітківці та меншу експресію CD68.

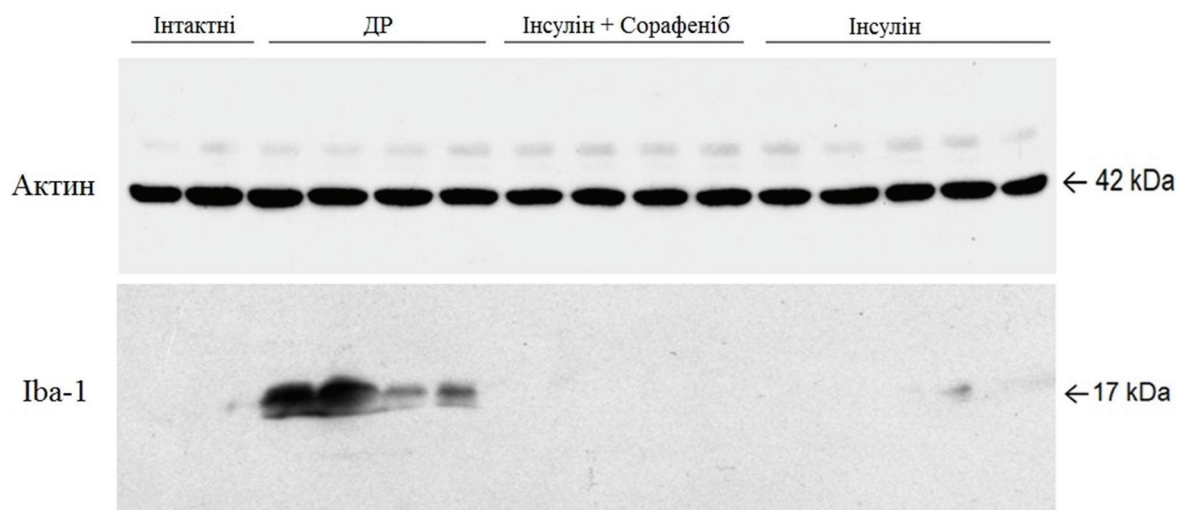
Як відомо, маркером активованої мікроглії можна вважати Iba-1 [11, 12]. Активацію його експресії у сітківці при ДР було підтверджено даними імуноблотингового дослідження (рис. 2).

Цей маркер не виявлявся у тканинах сітківки інтактних щурів, але за умов ДР був значно збільшеним. Лікування інсуліном супроводжувалося виявленням слідових концентрацій Iba-1, тоді як при застосуванні інсуліну з сорафенібом маркер у тканинах сітківці не виявлявся. Такий результат вказував на можливість попередження активації мікроглії та резидентних макрофагів у діабетичній сітківці при блокаді клітинних протеїнкіназ сорафенібом.

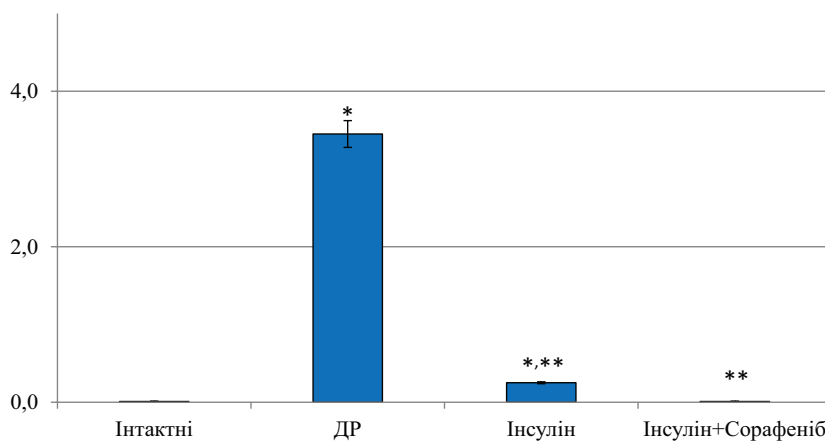
У експериментальному дослідженні при аналогічній моделі ДР також було показано збільшення експресії Iba-1 та інших факторів запалення у ранній термін [20]. Порівняно з

контролем, кількість мікроглії та експресія білка Iba-1 у сітківці діабетичних щурів зростає з 1-го до 24-го тижнів діабету, що було найбільш очевидним на 12-му тижні. Встановлено збільшення експресії Iba1 при моделях ЦД як 1-го, так і 2-го типів у макак-резусів вже на ранніх стадіях ДР [21]. Отже, можна вважати доведеним факт ініціального тригерного значення активації мікроглії та резидентних макрофагів при переключенні метаболічної відповіді при гіперглікемії на запальну з подальшим прогресування ДР. Показане нами запобігання активації мікроглії під впливом блокади клітинних протеїнкіназ сорафенібом з одного боку підтверджувало значення протеїнкіназної системи у розвитку ДР, а з іншого показувало новий механізм лікувального ефекту по відношенні до мікроглії.

Такими шляхами принципово може бути MAPK/ERK, який у судинному ендотелії надмірно активується при гіперглікемії [22], а його гальмування дипептидом карнозином, що складається із залишків амінокислот β -аланіну та гістидину, попереджає розвиток ДР [23].



а



б

Рис. 2. Вміст Iba-1 у тканинах сітківки (ум. од.) у інтактних тварин (Інтактні) та через 3 місяці у контрольній групі без лікування (ДР), при введенні інсуліну (Інсулін) та інсуліну з сорафенібом (Інсулін+Сорафеніб);

а – репрезентативні блотограми актину і Iba-1;

б – результати денситометричного аналізу блотограм (співвідношення до рівня актину); * – $p < 0,05$ порівняно з інтактними; ** – $p < 0,05$ порівняно з контролем без лікування

У дослідженні нової наноструктурованої мікроемульсійної системи для доставки сорафенібу до сітківки щурів, із діабетом, індукованим стрептозотоцином, показано, що вона значно пригнічувала експресію мРНК TNF α , NF- κ B, рецепторів факторів росту ендотелію судин 1 (VEGFR1) і 2 (VEGFR2) та інших про-запальних регуляторів [24].

Застосування графенового нанокompозиту сорафенібу, а також сополімеру наночастинок золота з сорафенібу тозилатом дозволяло

ефективно знижувати експресію VEGF in vitro [25], так і при неоваскуляризації сітківки у пацієнтів з ДР [26].

Таким чином, показаний нами ефект сорафенібу на гальмування ранньої реакції мікроглії і резидентних моноцитів при гіперглікемії, що полягало у зменшенні вмісту Iba-1 і експресії CD68 у сітківці, вказував на ще один можливий механізм попередження розвитку ДР за рахунок блокади клітинних протеїназ.

ВИСНОВКИ

1. Через 7 дів після моделювання ЦД CD68-позитивне забарвлення було відмічено навколо судин у хоріоїдальному сплетінні, по ходу судин вздовж внутрішньої поверхні сітківки та біля судин внутрішнього плексіформного шару. Кількість забарвлених елементів та інтенсивність забарвлення через 28 дів збільшувалися, а через 3 місяці з'являлася численна популяція поодиноких CD68-позитивних клітини у внутрішніх шарах сітківки. Застосування інсуліну з сорафенібом суттєво зменшувало CD68-позитивне забарвлення сітківки.
2. Методом імунолотингу Iba-1 не був виявлений у тканинах сітківки інтактних щурів, але за умов ДР його експресія була на високому рівні. При лікуванні інсуліном виявлялися слідові концентрації Iba-1, а при застосуванні інсуліну з сорафенібом маркер не виявлявся.

Конфлікт інтересів. Авторка заявляє про відсутність конфлікту інтересів при написанні даної статті.

Джерело фінансування. Робота виконана на кафедрі офтальмології та оптометрії післядипломної освіти Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України, є фрагментом НДР кафедри «Розробка нових методів діагностики, лікування та профілактики рефракційних, запальних, дистрофічних і травматичних захворювань органу зору та їх клініко-експериментальне обґрунтування» (номер держреєстрації 0120U105324).

REFERENCES

1. Wang W, Lo ACY. Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Treatments. *Int J Mol Sci.* 2018 Jun 20;19(6):1816. DOI: 10.3390/ijms19061816.
2. 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.
3. 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.
4. 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/iov.17-21873.
5. 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.
6. Nian S, Lo ACY, Mi Y, Ren K, Yang D. Neurovascular unit in diabetic retinopathy: pathophysiological roles and potential therapeutic targets. *Eye Vis (Lond).* 2021 May 1;8(1):15. DOI: 10.1186/s40662-021-00239-1.
7. 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.
8. Grigsby JG, Cardona SM, Pouw CE, Muniz A, Mendiola AS, Tsing AT, Allen DM, Cardona AE. The role of microglia in diabetic retinopathy. *J Ophthalmol.* 2014;2014:705783. DOI: 10.1155/2014/705783.
9. Li X, Yu ZW, Li HY, Yuan Y, Gao XY, Kuang HY. Retinal microglia polarization in diabetic retinopathy. *Vis Neurosci.* 2021b May 3;38:E006. DOI: 10.1017/S0952523821000031.
10. 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.
11. Hendrickx DAE, van Eden CG, Schuurman KG, Hamann J, Huitinga I. Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. *J Neuroimmunol.* 2017 Aug 15;309:12-22. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2017.04.007.
12. Tian Y, Jain S, Kelemen SE, Autieri MV. AIF-1 expression regulates endothelial cell activation, signal transduction, and vasculogenesis. *American Journal of Physiology. Cell*

- Physiology. 2009;296(2):C256-66. DOI:10.1152/ajpcell.00325.2008.
13. Chiu IM, Morimoto ET, Goodarzi H, Liao JT, O'Keeffe S, Phatnani HP, Muratet M, Carroll MC, Levy S, Tavazoie S, Myers RM, Maniatis T. A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Cell Rep.* 2013 Jul 25;4(2):385-401. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.06.018.
14. Mohammad G, Kowluru RA. Diabetic retinopathy and signaling mechanism for activation of matrix metalloproteinase-9. *J Cell Physiol.* 2012 Mar;227(3):1052-61. DOI: 10.1002/jcp.22822.
15. 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.
16. 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.
17. Kernt M, Liegl RG, Rueping J, Neubauer AS, Haritoglou C, Lackerbauer CA, Eibl KH, Ulbig MW, Kampik A. Sorafenib protects human optic nerve head astrocytes from light-induced overexpression of vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and placenta growth factor. *Growth Factors.* 2010 Jun;28(3):211-20. DOI: 10.3109/08977191003604505.
18. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Weber A, Rehli M, Peuker A, Müller A, Kastenberger M, Brockhoff G, Andreesen R, Kreutz M. Expression of CD68 in non-myeloid cell types. *Scand J Immunol.* 2008 May;67(5):453-63. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2008.02091.x.
19. Hendrickx DAE, van Eden CG, Schuurman KG, Hamann J, Huitinga I. Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. *J Neuroimmunol.* 2017 Aug 15;309:12-22. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2017.04.007. Epub 2017 Apr 20. PMID: 28601280.
20. 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.
21. 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.
22. Liu Y, Chen J, Liang H, Cai Y, Li X, Yan L, Zhou L, Shan L, Wang H. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells not only ameliorate blood glucose but also protect vascular endothelium from diabetic damage through a paracrine mechanism mediated by MAPK/ERK signaling. *Stem Cell Res Ther.* 2022 Jun 17;13(1):258. DOI: 10.1186/s13287-022-02927-8.
23. Guo Y, Guo C, Ha W, Ding Z. Carnosine improves diabetic retinopathy via the MAPK/ERK pathway. *Exp Ther Med.* 2019 Apr;17(4):2641-2647. DOI: 10.3892/etm.2019.7223.
24. Santonocito M, Zappulla C, Viola S, La Rosa LR, Solfato E, Abbate I, Tarallo V, Apicella I, Platania CBM, Maugeri G, D'Agata V, Bucolo C, De Falco S, Mazzone MG, Giuliano F. Assessment of a New Nanostructured Microemulsion System for Ocular Delivery of Sorafenib to Posterior Segment of the Eye. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 22;22(9):4404. DOI: 10.3390/ijms22094404.
25. Rahiminezhad Z, Tamaddon A, Dehshahri A, Borandeh S, Abolmaali SS, Najafi H, Azarpira N. PLGA-graphene quantum dot nanocomposites targeted against $\alpha v \beta 3$ integrin receptor for sorafenib delivery in angiogenesis. *Biomater Adv.* 2022 Jun;137:212851. DOI: 10.1016/j.bioadv.2022.212851.
26. Dave V, Sharma R, Gupta C, Sur S. Folic acid modified gold nanoparticle for targeted delivery of Sorafenib tosylate towards the treatment of diabetic retinopathy. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2020 Oct;194:111151. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2020.111151.

Article history:

Received: 14.12.2024

Revision requested: 18.12.2024

Revision received: 10.02.2025

Accepted: 25.03.2025

Published: 30.03.2025

EXPRESSION OF IONIZED CALCIUM-BINDING ADAPTOR MOLECULE-1 (Iba-1) AND CD68 IN EXPERIMENTAL DIABETIC RETINOPATHY AND INFLUENCE OF ITS BLOCKADE OF CELLULAR PROTEIN KINASE

Usenko K.O.

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

usenko1205@gmail.com

Background. In the development of diabetic retinopathy (DR), an important role belongs to the signaling pathways of cellular protein kinases, which implement the effects of external factors. Their blockade is a reasonable measure to prevent the development of DR, which, probably, can be implemented through inhibition of the pro-inflammatory role of retinal microglia.

Aim: to study the state of retinal microglia by the content of Iba-1 and CD68 expression in experimental DR and the effect of the use of the cellular protein kinase blocker Sorafenib.

Materials and methods. In male Wistar rats, DR was modeled by a single injection of streptozotocin (50 mg/kg; Sigma-Aldrich, Co, China). Rats were divided into 3 groups: control, with the introduction of Insulin (30 U; NovoNordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark) and with the introduction of Insulin and Sorafenib (50 mg/kg; Cipla, India). Immunohistochemical study was performed using monoclonal antibodies against CD68 (Clone KP-1, Master Diagnostica, Spain). Determination of the content of Iba-1 in retinal tissue lysates was performed by immunoblotting (Invitrogen, USA).

Results. Seven days after streptozotocin administration, CD68-positive staining was observed around the vessels in the choroid plexus, along the course of the vessels along the inner surface of the retina, and near the vessels of the inner plexiform layer. The number of stained elements and the intensity of staining increased after 28 days, and after 3 months, a large population of single CD68-positive cells appeared in the inner layers of the retina. The use of Insulin with Sorafenib significantly reduced CD68-positive staining of the retina. Iba-1 was not detected in retinal tissues of intact rats by immunoblotting, but under DR conditions its expression was at a high level. Trace concentrations of Iba-1 were detected with insulin treatment, while the marker was not detected with Insulin and Sorafenib.

Conclusion. A decrease in the content of Iba-1 and expression of CD68 in the diabetic retina under the influence of Sorafenib was shown, which indicated the inhibition of early activation of microglia and resident monocytes during hyperglycemia.

Key words: diabetic retinopathy, microglia, Iba-1, CD68, Sorafenib.