

Механізми розвитку ранньої діабетичної ретинопатії (експериментальне дослідження)

For citation: Archive of Ophthalmology of Ukraine. 2024;12(3):199-204. doi: 10.22141/2309-8147.12.3.2024.393

Резюме. Актуальність. Вивчення механізмів діабетичної ретинопатії (ДР) має бути комплексним та включати оцінку різних взаємопов'язаних клітинних та молекулярних процесів, що ініціюються гіперглікемією. **Мета дослідження:** вивчити механізми розвитку початкової стадії ДР в експерименті з метою визначення основних та другорядних патологічних процесів у сітківці. **Матеріали та методи.** У щурів-самців лінії Wistar моделювали цукровий діабет і ДР шляхом одноразового введення стрептозотоцину (50 мг/кг; Sigma-Aldrich, Co, China). На 28-му добу експерименту проводили імуногістохімічне дослідження з використанням моноклональних антитіл проти гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP), нейронспецифічної енолази (NSE), тяжких нейрофіламентів, каспази-3 (ThermoFisher Scientific, США), протеїну S100 (Master Diagnostica, США) і васкулоендотеліального фактора росту (VEGF; Invitrogen, США). **Результати.** До ранніх проявів ДР відносилися набряк та розпушення шарів сітківки, дилатація венозного русла з явищами мікротромбозу, утворення дифузних зон ішемії, вогнища патологічного ангиогенезу (мікроаневризми), дегенерація гангліонарних клітин, розрідження ядерних шарів сітківки. Астроцити, клітини Мюллера та їх відростки активно експресували GFAP і протеїн S100, що свідчило про розвиток реактивного гліозу. Перенавантаження цих клітин кальцієм могло сприяти їх загибелі через апоптоз, що було підтверджено збільшенням експресії каспази-3. Суттєве збільшення експресії VEGF макроглією, відростки якої утворювали щільні муфти навколо капілярів сітківки, могло стимулювати патологічний ангиогенез. Розвиток нейродегенерації було підтверджено суттєвим зниженням експресії нейрофіламентів у шарах нервових волокон та збільшенням нейронального маркера пошкодження NSE. **Висновки.** Надмірна активація макроглії (реактивний гліоз) може вважатися першочерговою ланкою патогенезу ДР, корекція якої може доповнити анти-VEGF-терапію або застосовуватися окремо задля попередження розвитку ДР на ранніх етапах.

Ключові слова: діабетична ретинопатія; реактивний гліоз; астроцити; клітини Мюллера; S100; GFAP; VEGF; NSE; нейрофіламенти; каспаза-3

Вступ

У сучасному світі цукровий діабет (ЦД) є серйозною медико-соціальною проблемою [1]. У 2017 році у світі загинуло близько 4 млн осіб, половина з яких молодша за 60 років [2]. Поширеність ЦД становила 9,3 % (463 млн) у 2019 р., очікується, що вона зросте до 10,2 (578 млн) до 2030 р. та до 10,9 (700 млн) — до 2045 р. [2]. Частим мікросудинним ускладненням ЦД є діабетична ретинопатія (ДР), яка вражає третину осіб з ЦД, швидко прогресує та є основною причиною сліпоти [3].

За класичним уявленням, ДР характеризується складним комплексом патологічних і прогресуючих змін мікроциркуляції сітківки (мікроангіопатія), що призводить до збільшення проникності судин, набряку, вазорегресії з утворенням поширених ділянок ішемії і неоваскуляризації [4]. З іншого боку, вважається, що основним патологічним процесом є комплексне ушкодження судин, клітин сітківки та нейронів, що становлять нейроваскулярну функціональну одиницю [5]. Отже, гліальні, нервові та мікросудинні порушення у сітківці виникають одночасно та взаємно посилюють один одного.

 © 2024. The Authors. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License, CC BY, which allows others to freely distribute the published article, with the obligatory reference to the authors of original works and original publication in this journal.

Для кореспонденції: Усенко Катерина Олександрівна, кандидат медичних наук, доцент кафедри офтальмології ІПО, Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, бульв. Тараса Шевченка, 13, м. Київ, 01601, Україна; e-mail: usenko1205@gmail.com; тел. +380 (97) 952-38-41

For correspondence: Usenko Kateryna, PhD in Medicine, Department of Ophthalmology, Bogomolets National Medical University, Taras Shevchenko boulevard, 13, Kyiv, 01601, Ukraine; e-mail: usenko1205@gmail.com; phone: +380 (97) 952-38-41

Full list of author information is available at the end of the article.

Таким чином, вивчення механізмів ДР має бути комплексним та включати оцінку різних взаємопов'язаних клітинних та молекулярних процесів, що ініціюються гіперглікемією.

Мета: вивчити механізми розвитку початкової стадії ДР в експерименті з метою визначення основних та другорядних патологічних процесів у сітківці.

Матеріали та методи

При виконанні роботи керувалися нормами та принципами Директиви 2010/63 ЄС із захисту тварин, Гельсінської декларації (2008) та вимогами Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 1759-VI від 15.12.2009). Тварин тримали в умовах віварію на стандартному раціоні.

До дослідження залучено 15 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 (pH 4,5). Протягом 16 годин до виконання ін'єкції тварин не годували, а протягом 24 годин після — поїли 5% розчином глюкози. У подальшому кожні три доби контролювали рівень глікемії за допомогою глюкометра та одноразових тест-смужок (ACCU-Chek Instant, Roche, Mannheim, Germany) у крові, забраної з хвостової вени натще. У якості контролю введення стрептозотоцину 5 щурам вводили тільки цитратний буфер. Через 3 доби після ін'єкції вміст глюкози у крові тварин, яким вводили стрептозотин, був не менше 15 ммоль/л; у жодного щура, якому було введено тільки цитратний буфер, вміст глюкози у крові не перевищував 6,1 ммоль/л.

Протягом експерименту у тварин відмічена виражена полідипсія, поліурія, кетон- та глюкозурія; тварини суттєво втрачали вагу, що дозволяло вважати адекватною застосовану модель відтворення у щурів інсулінозалежного ЦД з кетозом.

Тварин виводили з експерименту через 28 діб після моделювання гіперглікемії шляхом смертельної ін'єкції тіопенталу (75 мг/кг) та декапітації. 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 проти гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP), нейронспецифічної енолази (NSE), тяжких нейрофіламентів (NF) і каспази-3 (ThermoFisher Scientific, США), протеїну S100 (Master Diagnostica, США) і васкулоендотеліального фактора росту (VEGF; Invitrogen, США).

Зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном. Мікроскопічне дослідження та фотоархівування проводили з використанням світлооптичних мікроскопів Zeiss (Німеччина) з системою обробки результатів Axio Imager A2.

Оцінку інтенсивності імуноспецифічного забарвлення проводили згідно з рекомендаціями D. Dabbs (2014) на підставі візуально-аналогової шкали [6]. Оцінка 0 балів відповідала відсутності забарвлення, 1 — слабкій, 2 — середній і 3 — високій інтенсивності забарвлення.

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 $P < 0,05$.

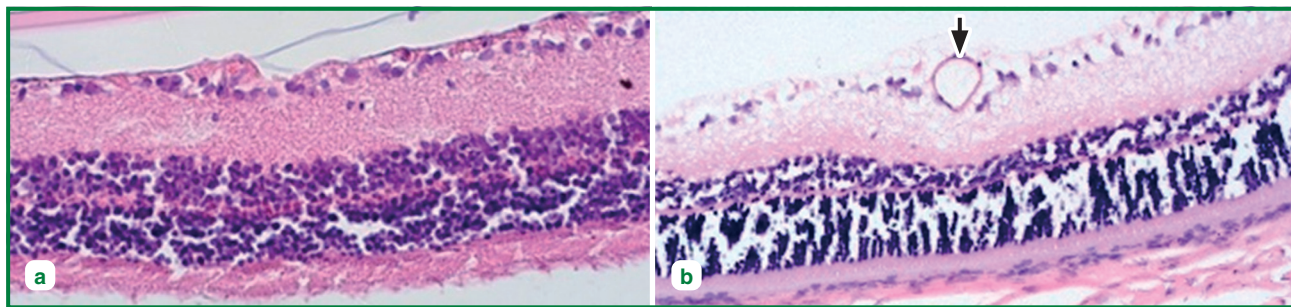
Результати та обговорення

Порівняно із сітківкою інтактних щурів при розвитку ЦД спостерігалися певні специфічні морфологічні ознаки, які відповідали типовим проявам ДР (рис. 1) [7].

Спостерігалися набряк та розпушення шарів нервових волокон, гангліонарних клітин і внутрішнього плексиформного шару (рис. 1b). На внутрішній поверхні сітківки утворювалися вогнища патологічного ангиогенезу — мікроаневризми (рис. 1b, чорна стрілка). Самі гангліонарні клітини мали ознаки дегенерації (вакуолізація та гіперхромія цитоплазми, пікноз ядер), суттєво знижувалася їх щільність.

У внутрішньому плексиформному шарі відмічалися дифузні зони ішемії, суттєво знижувалася щільність нервових волокон. Венули розширені, подекуди з явищами мікротромбоутворення. Ядерні шари сітківки розряджені, щільність клітин суттєво знижена, наявні протяжні зони ішемії. Спостерігалися витончення та порушення будови шару фоторецепторів. Встановлені зміни вказували на розвиток ДР з наявністю нейродегенерації, мікроангіопатії та ішемії тканин сітківки.

Проведене імуногістохімічне дослідження дозволило встановити деякі молекулярні механізми порушень, що були виявлені (рис. 2).



**Рисунок 1. Сітківка щура; забарвлення гематоксилін-еозин; $\times 200$:
a — інтактна тварина; b — через 28 діб після моделювання гіперглікемії**

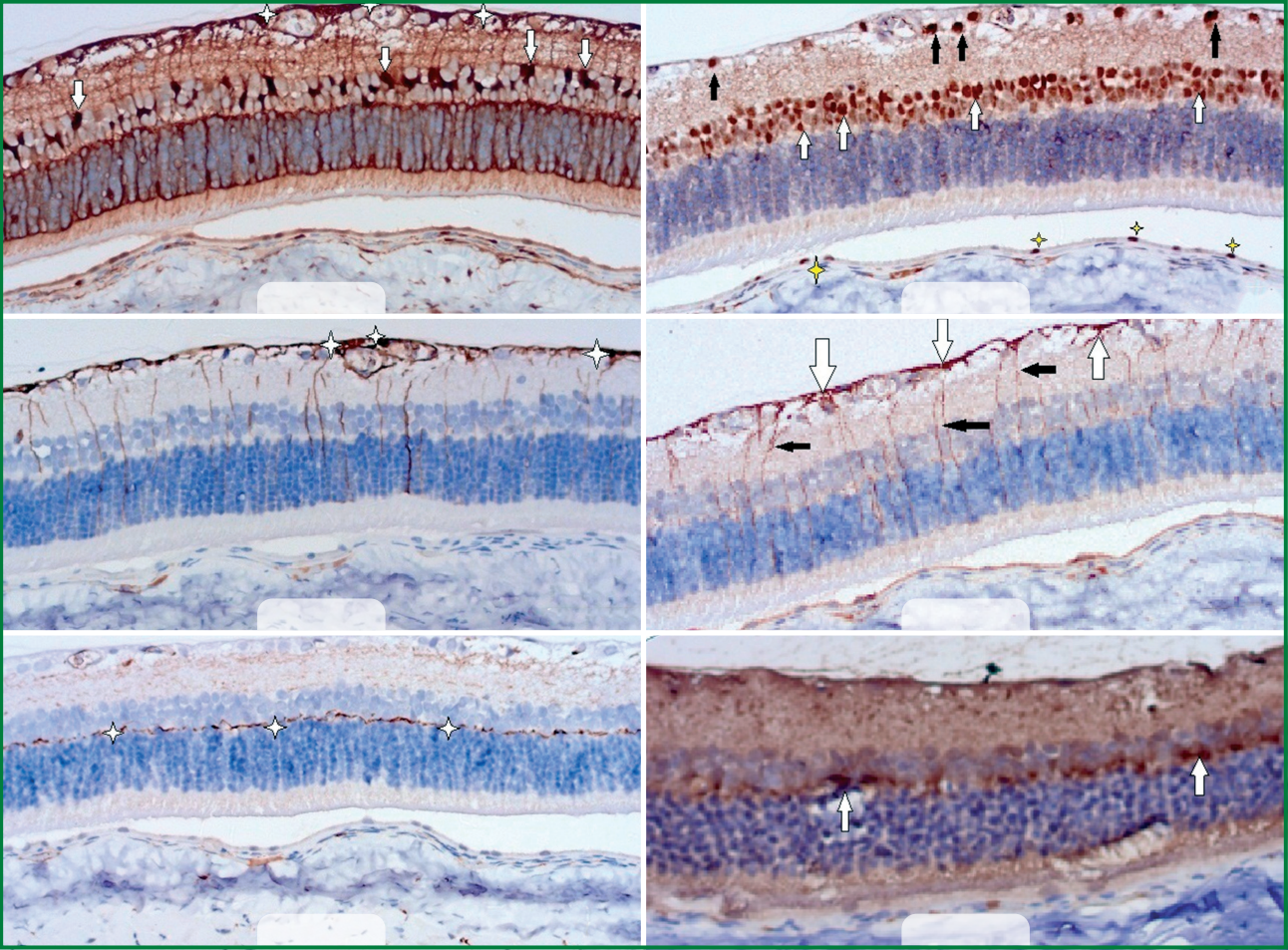


Рисунок 2. Сітківка щура через 28 днів після моделювання гіперглікемії. Репрезентативні результати імуногістохімічного виявлення протеїну S100, GFAP, NF, VEGF, каспази-3 та NSE (позначено на мікрофото); дозабарвлення гематоксиліном; $\times 200$

Експресія кальцій-зв'язуючого протеїну S100 була значно вираженою, інтенсивність специфічного забарвлення у 1,4–1,6 рази ($p < 0,05$) перевищувала таку в інтактних тварин (рис. 3).

Найбільш інтенсивно (до 4 балів за шкалою D. Dabbs) забарвлювалися клітини Мюллера, тіла яких розташовувалися у внутрішньому ядерному шарі та були суттєво збільшені, мали полігональну форму (рис. 2, S100, білі стрілки), а їх відростки радіально перетинали

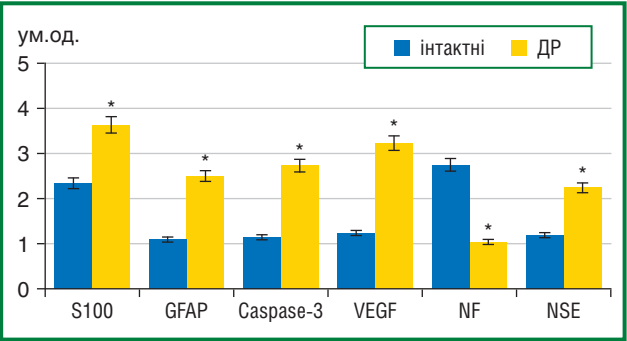


Рисунок 3. Інтенсивність специфічного забарвлення маркерів (середні значення за шкалою D. Dabbs, ум.од.) у тканинах сітківки інтактних тварин при ДР; * — $p < 0,05$ порівняно з інтактними

сітківку, утворюючи сплетення на її внутрішній поверхні та на межі зовнішнього ядерного шару і шару фоторецепторів. Такі зміни вказували на активацію клітин Мюллера — їх реактивний гліоз [8, 9].

Якщо у інтактних тварин S100-позитивне забарвлення виявлялося лише у тілах клітин Мюллера, то при ДР — ще й у відростках, що свідчило про перенавантаження активованих клітин Мюллера кальцієм. Це могло спричиняти їх загибель через апоптоз, що підтверджувало специфічне забарвлення на каспазу-3 (рис. 2, Caspase-3). Чітко помітно, що поширення каспаза-3-специфічного забарвлення відповідало поширенню S100-позитивного забарвлення у клітинах Мюллера (рис. 2, чорні стрілки, Caspase-3), астроцитах та сплетеннях їх волокон вздовж внутрішньої поверхні сітківки (рис. 2, білі стрілки, Caspase-3). У інтактних тварин експресія каспази-3 була слабо виражена у поодиноких позитивно забарвлених радіальних волокнах внутрішнього плексиформного та гангліонарного шарів (інтенсивність забарвлення до 1 бала за шкалою D. Dabbs). Інтенсивність каспаза-3-позитивного забарвлення при ДР була суттєво (у 1,6 рази; $p < 0,05$) збільшена (рис. 3).

Іншим важливим маркером реактивного гліозу сітківки при ДР є GFAP [9, 10]. Тканинна експресія цього маркера (рис. 2, GFAP) також чітко відповідала S100

і підтверджувала розвиток реактивного гліюзу із залученням астроцитів та клітин Мюллера. Інтенсивність GFAP-позитивного забарвлення також суттєво перевищувала таку у інтактних тварин (рис. 3).

Інтенсивно експресували протеїни S100, GFAP та каспазу-3 астроцити, відростки яких утворювали щільні сплетення вздовж внутрішньої поверхні сітківки та муфтоподібно охоплювали мікроаневризми (рис. 2, білі зірочки, S100, GFAP і Caspase-3). Відомо, що астроцити першими активуються при метаболічному стресі за умов гіперглікемії та утворюють численні прозапальні цитокіни, фактори росту, хемокини, що ініціює пошкодження нейронів та підсилює проникність судин і ангиогенез у відповідь на ішемію [8].

Експресія основного проангіогенного фактора ДР — VEGF — притаманна астроцитам та клітинам Мюллера [8, 9], що встановлено і у нашому дослідженні (рис. 2, VEGF). Виразене VEGF-позитивне забарвлення з інтенсивністю до 3–4 балів за шкалою D. Dabbs відмічене у численних поліморфних клітинах внутрішнього ядерного шару, серед яких були округлі, полігональні та відросткові клітини (рис. 2, білі стрілки, VEGF). Також виразене VEGF-позитивне забарвлення (до 4 балів за шкалою D. Dabbs) відмічене у крупних гліотичних астроцитах (рис. 2, чорні стрілки, VEGF). Інтенсивність VEGF-позитивного забарвлення при ДР у 2,6 раза перевищувала таку у інтактних тварин ($p < 0,05$; рис. 3).

Відомо, що активація за умов гіперглікемії клітин Мюллера і астроцитів призводить до стану реактивного гліюзу з надмірною експресією VEGF та прозапальних цитокінів [9, 11]. Ці положення знаходять своє підтвердження і у результатах нашого дослідження.

Поліморфізм VEGF-позитивних клітин внутрішнього ядерного шару дає змогу припустити, що і інші нервові клітини сітківки, крім клітин Мюллера, можуть долучатися до цього процесу. До таких могли відноситися горизонтальні, біполярні та амакринові клітини [12].

VEGF-позитивні клітини також були виявлені у судинній оболонці, за морфологією це були округлі крупні клітини, які відповідали морфології пігментного епітелію (рис. 2, жовті зірочки, VEGF) [13]. За умов гіперглікемії останні здатні до епітеліально-мезенхімального переходу або трансдиференціювання з утворенням фіброзних епіретинальних мембран.

Пусковим механізмом виявлених змін може бути дисфункція нервово-судинного блоку сітківки внаслідок метаболічних зсувів при гіперглікемії [14]. Це сприяє уповільненню кровотоку, екстазії венул, мікротромбоутворенню, збільшенню проникності судин сітківки, що призводить до їх оклюзії, погіршенню перфузії тканин сітківки та формуванню зон ішемії, гіпоксії та інфаркту у шарах нервових волокон [15]. Усі ці явища ми й спостерігали у наших дослідженнях.

Безпосереднім наслідком гіпоксії є активація проангіогенних факторів — VEGF та прозапальних цитокінів, що обумовлює нейродегенерацію, ексудати у сітківці та її неоваскуляризацію [16]. Імуногістохімічне виявлення нейромаркерів NSE та NF показало їх значущі, але різноспрямовані зміни при ДР (рис. 2, NSE і NF). Експресія NF суттєво знижувалася (у 2,6 раза; $p < 0,05$), що

свідчило на користь розвитку нейродегенерації. У цьому плані необхідно зазначити, що на сучасному етапі патогенез ДР суттєво доповнений розумінням того, що поряд з розвитком мікроангіопатії у сітківці виникає специфічне пошкодження нервової тканини — діабетична ретинальна нейродегенерація [12, 16, 17].

У інтактних тварин NF-позитивні волокна виявлялися у плексиформних шарах та шарі нервових волокон. Вважається, що у внутрішньому плексиформному шарі позитивно забарвлюються аксони горизонтальних клітин, у зовнішньому плексиформному шарі — аксони амакринових клітин, а в шарі нервових волокон — аксони гангліонарних клітин [18]. Інтенсивність їх забарвлення відповідала 2–3 балам за шкалою D. Dabbs. При ДР у шарах сітківки відмічено значне зниження інтенсивності NF-позитивного забарвлення у зовнішньому плексиформному шарі (до 1 бала за шкалою D. Dabbs; рис. 2, білі зірочки, NF), а у внутрішньому плексиформному шарі воно фактично зникало. Отже, експресія NF за умов гіперглікемії суттєво пригнічувалася, що певною мірою відображало процеси діабетичної нейродегенерації сітківки.

Відомо, що експресія NSE у клітинах нервової системи фіксується на незначному рівні, але при пошкодженні, особливо при ішемії, вона суттєво збільшується [19]. При цьому NSE виходить із нервових клітин та визначається у крові. За умов ДР NSE-позитивне забарвлення виявлялося у сплетеннях волокон та тілах нейронів плексиформних шарів (рис. 2, білі стрілки, NSE). Інтенсивність забарвлення становила до 3 балів за шкалою D. Dabbs, що достеменно перевищувало такий показник у інтактних тварин (рис. 3). У шарах сітківки відмічено значне фонове забарвлення, що свідчило про пошкодження нейронів сітківки та вихід NSE у тканини.

Таким чином, при розвитку ДР ми спостерігали збільшення експресії у тканинах сітківки протеїну S100, GFAP, каспази-3, VEGF і NSE при зниженні NF. Пускову роль у цих процесах відіграє порушення вуглеводного обміну — гіперглікемія, яка активує глікування білка, накопичення в клітинах поліолів, а в тканинах — кінцевих продуктів глікування (AGE), підвищення активності гексозамінового шляху та протеїнази [16]. Накопичення метаболітів із токсичною дією призводить до активації дуже чутливої популяції клітин сітківки — мікроглії, які активуються, проліферують та інфільтрують усі шари сітківки [20]. За рахунок секреції широкого спектра прозапальних цитокінів, глутамату, активних форм кисню та інших запальних медіаторів мікроглія залучає астроцити і клітини Мюллера, які в нормі знаходяться у стані спокою, що призводить до розвитку реактивного гліюзу [9].

У активованій макроглії, у свою чергу, надмірно експресуються прозапальні інтерлейкіни, цитокіни, фактори росту, що посилює проникність судин сітківки та ініціює фіброзно-васкулярну проліферацію в ішемічних ділянках [11]. На цьому тлі відбувається погіршення стану нейрональних елементів сітківки, що, у свою чергу, призводить до нейронального пошкодження. Відображенням цього процесу є активація експресії протеїну S100, GFAP і VEGF в астроцитах та клітинах Мюллера, що можна вважати третьою хвилею (після каскаду мета-

болічного пошкодження і ішемії сітківки) патологічних реакцій на гіперглікемію у сітківці.

Отже, надмірна активація макроглії (реактивний гліоз) може вважатися першочерговою ланкою патогенезу ДР (і судинних, і нервових порушень), яка потребує специфічної корекції. Оскільки надекспресія VEGF є наслідком гліозу, застосування анти-VEGF-терапії може бути доповнено засобами, що гальмують гліотичні реакції. З іншого боку, цей напрямок терапії може бути окремо застосований на ранніх етапах ДР з метою попередження її розвитку.

Висновки

1. На термін 28 діб після моделювання гіперглікемії чітко формувалися ранні прояви ДР: набряк та розпушення шарів сітківки, дилатація венозного русла з явищами мікротромбозу, утворення дифузних зон ішемії, вогнища патологічного ангиогенезу (мікроаневризми), дегенерація гангліонарних клітин, розрідження ядерних шарів сітківки.

2. Астроцити, клітини Мюллера та їх відростки активно експресували GFAP і протеїн S100, що свідчило про розвиток реактивного гліозу. Перенавантаження цих клітин кальцієм могло сприяти їх загибелі через апоптоз, що було підтверджено збільшенням експресії каспази-3. Суттєве збільшення експресії VEGF макроглією, відростки якої утворювали щільні муфти навколо капілярів сітківки, могло стимулювати патологічний ангиогенез.

3. Розвиток нейродегенерації було підтверджено суттєвим зниженням експресії нейрофіламентів у шарах нервових волокон та збільшенням нейронального маркера пошкодженняNSE.

Відмова від відповідальності. Автор заявляє, що висловлені у поданій статті думки є його власними, а не офіційними позиціями установи.

Конфлікт інтересів. Автор заявляє про відсутність конфлікту інтересів та власної фінансової зацікавленості при підготовці даної статті.

Інформація про фінансування. Це дослідження виконано за ініціативи кафедри патофізіології НМУ імені О.О. Богомольця (Київ, Україна) та фінансується за бюджетною програмою МОЗ України, державний реєстраційний номер 0122U001308.

References

1. 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.
2. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al.; 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, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract*. 2019 Nov;157:107843. doi: 10.1016/j.diabres.2019.107843.
3. 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.
4. Duh EJ, Sun JK, Stitt AW. Diabetic retinopathy: current un-

derstanding, mechanisms, and treatment strategies. *JCI Insight*. 2017 Jul 20;2(14):e93751. doi: 10.1172/jci.insight.93751.

5. 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.

6. Thompson LDR, Dabbs DJ. *Diagnostic Immunohistochemistry: theranostic and genomic applications*. 4th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2014. 960 p.

7. 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.

8. 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.

9. Sundstrom JM, Hernández C, Weber SR, et al. 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/iov.17-23678.

10. Ziablitzev SV, Zhupan DB, Dyadyk OO. The influence of a benzodiazepine receptor agonist on the state of glia in the diabetic retinopathy. *Fiziologichnyi Zhurnal*. 2023;69(6):33-42. Ukrainian. doi: doi.org/10.15407/fz69.06.033.

11. Xu J, Chen LJ, Yu J, et al. Involvement of Advanced Glycation End Products in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Cell Physiol Biochem*. 2018;48(2):705-717. doi: 10.1159/000491897.

12. Ren J, Zhang S, Pan Y, et al. Diabetic retinopathy: Involved cells, biomarkers, and treatments. *Front Pharmacol*. 2022 Aug 9;13:953691. doi: 10.3389/fphar.2022.953691.

13. Shukal D, Bhadresha K, Shastri B, Mehta D, Vasavada A, Johar K Sr. Dichloroacetate prevents TGFβ-induced epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2020 Aug;197:108072. doi: 10.1016/j.exer.2020.108072.

14. Newman EA. Functional hyperemia and mechanisms of neurovascular coupling in the retinal vasculature. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013 Nov;33(11):1685-1695. doi: 10.1038/jcbfm.2013.145.

15. 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.

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

17. Van de Kreeke JA, Darma S, Chan Pin Yin JMPL, et al. The spatial relation of diabetic retinal neurodegeneration with diabetic retinopathy. *PLoS One*. 2020 Apr 16;15(4):e0231552. doi: 10.1371/journal.pone.0231552.

18. Völgyi B, Bloomfield SA. Axonal neurofilament-H immunolabeling in the rabbit retina. *J Comp Neurol*. 2002 Nov 18;453(3):269-279. doi: 10.1002/cne.10392.

19. 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.

20. Grigsby JG, Cardona SM, Pouw CE, et al. The role of microglia in diabetic retinopathy. *J Ophthalmol*. 2014;2014:705783. doi: 10.1155/2014/705783.

Отримано/Received 17.05.2024
Рецензовано/Revised 25.06.2024
Прийнято до друку/Accepted 08.07.2024 ■

Information about author

Usenko Kateryna, PhD in Medicine, Department of Ophthalmology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine; e-mail: usenko1205@gmail.com; phone: +380 (97) 952-38-41; <https://orcid.org/0000-0001-9907-6109>

Conflicts of interests. Author declares the absence of any conflicts of interests and own financial interest that might be construed to influence the results or interpretation of the manuscript.

Information about funding. This study was conducted at the initiative of the Department of Pathophysiology of the Bogomolets National Medical University (Kyiv, Ukraine) and is funded by the budget program of the Ministry of Health of Ukraine, state registration number 0122U001308.

K.O. Usenko

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Mechanisms of early diabetic retinopathy development (experimental study)

Abstract. Background. The study of the diabetic retinopathy (DR) mechanisms should be comprehensive and include the assessment of various interconnected cellular and molecular processes initiated by hyperglycemia. The purpose was to study the mechanisms for the development of the initial stage of DR in an experiment in order to determine the main and secondary pathological processes in the retina. **Materials and methods.** Diabetes mellitus and DR were modeled in male Wistar rats by a single injection of streptozotocin (50 mg/kg; Sigma-Aldrich Co, China). On the 28th day of the experiment, immunohistochemical studies were performed using monoclonal antibodies to glial fibrillary acidic protein (GFAP), neuron-specific enolase (NSE), heavy neurofilaments, caspase-3 (Thermo Fisher Scientific, USA), S100 protein (Master Diagnostica, USA) and vascular endothelial growth factor (VEGF; Invitrogen, USA). **Results.** Early manifestations of DR included edema and detached retinal layers, dilation of the venous bed with microthrombosis, formation of diffuse zones of ischemia, foci of pathological

angiogenesis (microaneurysms), degeneration of ganglion cells, retinal nuclear layer thinning. Astrocytes, Müller cells and their processes actively expressed GFAP and S100 protein, which indicated the development of reactive gliosis. Calcium overload in these cells could contribute to their death through apoptosis, which was confirmed by an elevated caspase-3 expression. A significant increase in the VEGF expression by macroglia whose processes formed tight couplings around the retinal capillaries could stimulate pathological angiogenesis. The development of neurodegeneration was confirmed by a significant decrease in the expression of neurofilaments in the nerve fiber layers and an increase in the neuronal damage marker, NSE. **Conclusions.** Excessive activation of macroglia (reactive gliosis) can be considered a primary link in the pathogenesis of DR whose correction can complement anti-VEGF therapy or be used separately to prevent the development of DR in the early stages.

Keywords: diabetic retinopathy; reactive gliosis; astrocytes; Müller cells; S100; GFAP; VEGF; NSE; neurofilaments; caspase-3