

Вплив блокади клітинних протеїнкіназ на експресію нейрофіламентів у сітківці при експериментальній діабетичній ретинопатії

For citation: Archive of Ophthalmology of Ukraine. 2025;13(1):51-58. doi: 10.22141/2309-8147.13.1.2025.404

Резюме. Актуальність. Діабетична ретинопатія (ДР) є основною причиною втрати зору серед пацієнтів з цукровим діабетом (ЦД). Одним із ключових механізмів її прогресування є нейродегенерація, що супроводжується зниженням рівня нейрофіламентів (NF) у сітківці. Клітинні протеїнкінази беруть участь у регуляції апоптозу та нейродегенеративних процесів при ДР. Вплив їхньої фармакологічної блокади на рівень NF у сітківці потребує подальшого вивчення. **Мета:** визначити експресію нейрофіламентів у сітківці при експериментальній діабетичній ретинопатії та вплив на неї фармакологічної блокади клітинних протеїнкіназ сорафенібом. **Матеріали та методи.** Дослідження проведено на 55 тримісячних самцях щурів лінії Wistar. Експериментальну ДР моделювали шляхом введення стрептозоцину (50 мг/кг). Тварин розподілили на три групи: контрольна (без лікування), група з введенням інсуліну та група з комбінованим введенням інсуліну та інгібітора протеїнкіназ сорафенібу (50 мг/кг). Уміст NF-H у тканині сітківки визначали методом імуноблотингу, а експресію — імуногістохімічним аналізом. Статистичний аналіз проводили методом ANOVA, вірогідними вважали відмінності при $p < 0,05$. **Результати.** При розвитку експериментальної ДР рівень NF-H у сітківці знижувався у 2,2 раза ($p < 0,05$) порівняно з інтактними тваринами, що свідчило про розвиток нейродегенерації. Введення інсуліну не впливало на рівень NF-H (зниження у 2,0 раза; $p < 0,05$), тоді як комбіноване застосування інсуліну та сорафенібу сприяло його частковому збереженню (зниження у 1,6 раза; $p < 0,05$). Крім того, застосування сорафенібу зменшувало гіперфосфорилювання нейрофіламентів, що могло бути пов'язане з його впливом на активність протеїнкіназ. **Висновки.** Фармакологічна блокада клітинних протеїнкіназ сорафенібом частково запобігає втраті NF-H у сітківці при експериментальній ДР, що вказує на перспективність цього підходу для захисту нейрональних структур від гіперглікемічного ушкодження.

Ключові слова: діабетична ретинопатія; нейродегенерація; нейрофіламенти; клітинні протеїнкінази; сорафеніб

Вступ

Патогенез діабетичної ретинопатії (ДР) на сьогодні цілком не вивчений, але відомо, що має в основі множинні механізми, серед яких запалення, активація імунної системи, оксидативний стрес та накопичення кінцевих продуктів глікування, активація поліолового, гексозамінового шляхів та шляху протеїнкінази C, янус-кінази/трансдуктора сигналів і активатора транс-крипції (JAK/STAT), мітохондріальна дисфункція,

ефекти ренін-ангіотензинової системи, модифікація гістонів і метилювання ДНК, дисбаланс місцевої продукції нейротропних факторів та нейродегенерація, які в сукупності призводять до дегенерації сітківки [1].

Нейродегенерація сітківки є процесом, який включає реактивний гліоз, зниження функції нейронів та їхню втрату [2]. У прогресуванні ДР нейродегенерація є одним з найбільш ранніх процесів: апоптоз та дисфункцію нейронів сітківки щурів можна спостерігати



© 2025. 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 AGE 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.

протягом 1 місяця від індукції в них цукрового діабету (ЦД) — ще до виявлення мікроангіопатії [3]. При цьому в цих клітинах виявляється надмірна експресія таких ключових проапоптотичних білків, як каспаза-3, Вах і Fas [4]. Крім того, мітохондріальна дисфункція та фрагментація також сприяють апоптозу нейронів сітківки при ЦД, що підтверджується виявленням у них значних концентрацій цитохрому С та апоптоз-індукуючого фактора (AIF) [5].

Шляхом додавання лютеїну в раціон шурів з ЦД було досягнуто інгібування продукції активних форм кисню в нейронах сітківки, чим було знижено темпи прогресування ДР [6]. Це відбулось шляхом зниження активації позаклітинної сигнал-регульованої кінази (ERK) і, як наслідок, підвищення рівнів синаптофізину та нейротрофічного фактора росту (BDNF) у тканинах сітківки, що вказує на вагомість оксидативного стресу в ході ретиальної нейродегенерації. Навіть на початкових етапах ДР відбувається порушення процесів нейроваскулярної регуляції сітківки, що полягає в опосередкованому гліоцитами і шляхами оксиду азоту контролі нейронів за кровонаповненням її внутрішніх мікросудин, які не мають автономної іннервації, в умовах значного метаболічного стресу [7, 8]. Шляхом проведення мультифокальної електроретинографії було виявлено порушення трансдукції фоторецепторів сітківки навіть на доклінічних стадіях ДР, що може пояснювати знижену контрастну та кольорову чутливість у пацієнтів з ЦД без судинних ознак ДР [9]. Імовірно, внаслідок порушення регуляції метаболізму в умовах ЦД, навіть за відсутності судинних ознак ДР, виявляється прогресуюче стоншення макулярного шару нервових волокон та гангліонарного і внутрішнього плексиформного шарів сітківки [3].

Нейрофіламенти (NF) є проміжними філаментами нейронів, що підтримують їхню структуру, розміри і форму та виконують низку інших функцій. До них належать легкі (NF-L), середні (NF-M), важкі (NF-H) NF, α -інтернексин (IV клас), периферин (III клас), що мають схожу структуру і складаються з 4 субодиниць, але мають різну молекулярну масу, структурну організацію, локалізацію та функції [10]. Автоімунні та запальні процеси, вплив іонізуючої радіації, нейротоксинів, природних процесів старіння організму, аксональне пошкодження впливають на функціонування NF. Крім того, ефект справляють стан функціонування нирок, ендокринної системи, метаболічний стрес, зокрема пов'язаний з ЦД, захворювання серцево-судинної системи та високий індекс маси тіла. У ході пост-трансляційної модифікації NF відбуваються процеси окиснення, нітрування, ацетилювання, цитрулінізації, фосфорилування, глікування, глікозилювання та інші хімічні перетворення NF. Функціонування та регуляцію експресії й модифікації NF порушують мутації у відповідних генах. До агрегації NF призводять гіперфосфорилування їхніх молекул, порушення аксонального транспорту, порушення білкової структури та взаємодії протеїнів, їхньої деградації [11]. Усі ці процеси певною мірою відбуваються в ході таких нейродегенеративних розладів, як бічний аміотрофічний склероз, хвороба

Паркінсона, хвороба Альцгеймера, діабетична нейро- та ретинопатія та інші. Водночас рівні цих білків підвищуються в сироватці крові та спинномозковій рідині. Це робить їх важливими біомаркерами нейродегенеративної патології [12].

У розвитку ДР важливу роль відіграють протеїнкінази, які регулюють сигнальні шляхи, пов'язані з запаленням, ангіогенезом, апоптозом та нейродегенерацією [13]. До групи мітоген-активованих кіназ (MAPK) відносять JNK (с-Jun N-термінальна кіназа, MAPK8), p38 MAPK, ERK1/2 (позаклітинні сигнал-активовані кінази) [14]. В умовах гіперглікемії, оксидативного стресу та запалення JNK (1–3) активують транскрипційні фактори с-Jun, ATF-2, що запускає апоптоз гангліонарних та амакринових клітин сітківки, а також пригнічує вплив інсуліну на сітківку через p70S6K1-залежний механізм [15]. При ЦД p38 MAPK активується і стимулює продукцію прозапальних цитокінів, як-от фактор некрозу пухлини альфа (TNF- α), інтерлейкін-1 бета (IL-1 β), інтерлейкін-6 (IL-6), а також ферментів індукованої синтази оксиду азоту (iNOS) і циклооксигенази-2 (COX-2). Гістоновий білок H3, який фосфорилується p38 MAPK, регулює транскрипційний фактор каппа-бі (NF- κ B) і тим самим також підвищує експресію цитокінів та хемокинів. Запалення, посилене таким чином p38 MAPK, значно погіршує перебіг ДР і опосередковано пошкоджує нейрони сітківки [16]. Шляхи JAK/STAT важливі для регулювання вродженої імунної відповіді мікроглії, макрофагів і нейтрофілів. Особливо JAK2/STAT3 активуються в умовах гіперглікемії і стимулюють продукцію прозапальних цитокінів, що сприяє пошкодженню та загибелі гангліонарних клітин сітківки [17]. Високий рівень глюкози крові активує експресію генів каталітичної субодиниці фосфатидилінозит-4,5-бісфосфат-3-кінази альфа (PIK3CA) і васкулоендотеліального фактора росту (VEGF), продукцію та фосфорилування PI3K, що в подальшому фосфорилує протеїнкіназу В альфа (AKT) і мішень рапаміцину ссавців (mTOR). Це призводить до секреції прозапальних факторів TNF- α , IL-1 β , клітинного апоптозу та пригнічення проліферації клітин сітківки. Також надмірна активація mTOR пригнічує процеси автофагії, що призводить до накопичення пошкоджених білків у нейронах та їхньої запрограмованої загибелі [18]. Блокування описаних шляхів, таким чином, може мати нейропротекторний ефект і створювати підґрунтя для розробки нових стратегій лікування і профілактики ДР.

Мета: визначити експресію нейрофіламентів у сітківці при експериментальній діабетичній ретинопатії та вплив на неї фармакологічної блокади клітинних протеїнкіназ сорафенібом.

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/ЕЕС (1986), Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», загальними етичними принципами експери-

ментів на тваринах, ухваленими Першим національним конгресом України з біоетики (2001) та експертним висновком комісії з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень при Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця.

У дослідження залучено 55 тримісячних щурів-самців лінії Wistar вагою 140–160 г. Експериментальний ЦД моделювали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину (50 мг/кг; Sigma-Aldrich, Co, Китай), 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, Німеччина) у крові, забраної з хвостової вени натще. Як контроль введення стрептозотоцину 5 щурам вводили тільки цитратний буфер, ще 5 інтактних щурів використано для отримання початкових даних (інтактний контроль). Через 3 доби після ін'єкції вміст глюкози у крові тварин, яким вводили стрептозотон, був не менше ніж 15 ммоль/л, в жодного з щурів, яким було введено тільки цитратний буфер, вміст глюкози у крові не перевищував 6,1 ммоль/л. Тварин спостерігали протягом 3 місяців.

Через 7 дів тварин зі стійкою гіперглікемією ($n = 45$) сліпим випадковим способом розділили на 3 групи по 15 особин. У 1-й групі (контроль) лікування гіперглікемії не проводили. У 2-й групі тваринам через день внутрішньоочеревинно вводили інсулін короткої дії (Actrapid HM Penfill, Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Данія) у дозі 30 Од. Тваринам 3-ї групи вводили інсулін (за схемою 2-ї групи), а також *per os* щоденно вводили розчин інгібітора протеїнкіназ сорафенібу (200 мг, Cipla, Індія) у дозі 50 мг/кг у вигляді саше.

Тварин виводили з експерименту через 7 і 28 дів 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. Із парафінових блоків на ротаційному мікротомі HM 325 (Thermo Shandon, Англія) виготовляли серійні гістологічні зрізи товщиною 2–3 мкм. Імуногістохімічне дослідження проводили з використанням моноклональних мишачих антитіл до NF-H (Neurofilaments 70/200 kDa, Monoclonal antibody, 2F11, Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, США). Зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном. Мікроскопічне дослідження та фотоархівування проводили із використанням світлооптичних мікроскопів ZEISS (Німеччина) з системою обробки результатів Axio Imager A2. Оцінку інтенсивності експресії проводили згідно з рекомендаціями D. Dabbs (2021) на підставі візуально-аналогової шкали: 0 балів — забарвлення відсутнє; 1 бал (+) — слабка інтенсивність забарвлення; 2 бали (++) — середня інтенсивність забарвлення; 3 бали (+++) — висока інтенсивність забарвлення [19].

Визначення вмісту NF-H у лізатах тканини сітківки проводили методом імуноблотингу. Зразки тканини витримували у скрапленому азоті, подрібнювали та

гомогенізували у 50 ммоль Tris-HCl буфера (pH 7,4) з додаванням інгібіторів фосфатаз та протеаз (Pierce Protease and Phosphatase inhibitor, ThermoScientific, США, #A32961). Електрофорез проводили у 8% поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS-PAGE) у камері для вертикального гелі-електрофорезу (BioRad, США). Протеїни з гелю переносили на нітроцелюлозну мембрану за допомогою електроблоту. Мембрани інкубували з моноклональними антитілами до NF-H (no. MA5-14981, rabbit, 1 : 1,000, Invitrogen, США). Антитіла до актину (β -actin (loading control), no. MA5-15739, mouse, 1 : 3,000, Invitrogen, США) використовували для його детекції 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, США, 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 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 відмінності при значенні $p < 0,05$.

Результати

Результати визначення вмісту NF-H у тканині сітківки щурів наведено на рис. 1. При розвитку експериментальної ДР через 3 місяці спостереження вміст NF-H суттєво зменшувався порівняно з інтактним контролем (у 2,2 раза; $p < 0,05$).

При застосуванні інсуліну вміст NF-H був зменшений такою ж мірою (у 2,0 раза; $p < 0,05$), що вказувало на відсутність впливу інсуліну на експресію NF-H. Натомість застосування разом з інсуліном ІПК сорафенібу сприяло збереженню експресії NF-H — порівняно з інтактним контролем він був знижений меншою мірою (в 1,6 раза; $p < 0,05$), при цьому його вміст був більшим, ніж у групі з введенням тільки інсуліну ($p < 0,05$; рис. 1b).

На блотограмах NF-H добре видно додаткову смужку на рівні 320 kDa (рис. 1a), що відображало накопичення гіперфосфорильованих ланцюгів нейрофіламентів. Відомо, що вони відображають порушення катаболізму цього структурного протеїну та його акумуляцію у клітинах з порушенням аксонального транспорту [20, 21].

Таких смужок не було у пробах з введенням інсуліну і сорафенібу, що могло вказувати на більш врегульований процес метаболізму нейрофіламентів при застосуванні блокади клітинних протеїнкіназ.

У сітківці інтактних щурів NF-H-позитивне забарвлення було виявлено в аксональних горбиках гангліонарних клітин та у вигляді поздовжніх волокон невели-

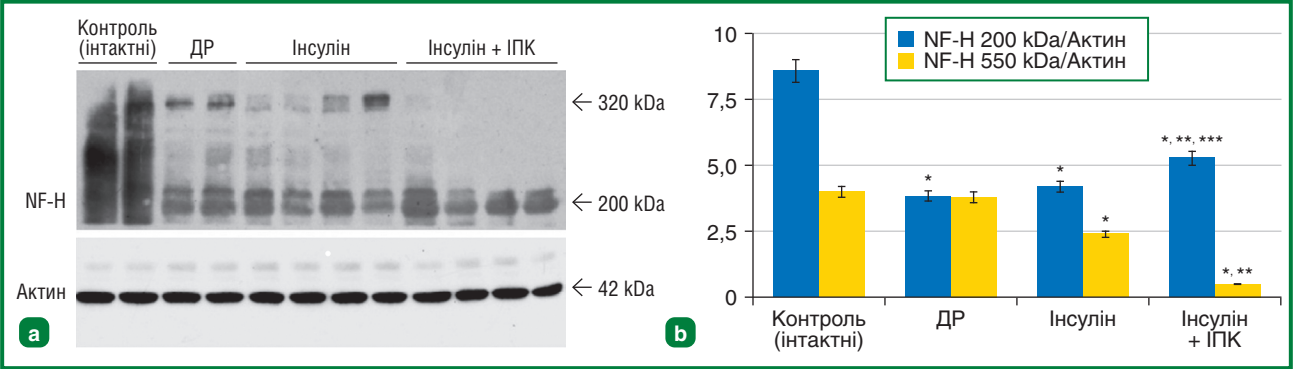


Рисунок 1. Уміст нейрофіламентів (NF-H) та актину у тканині сітківки контрольної групи на початку дослідження (Контроль (інтактні)), через 3 місяці у групах з діабетичною ретинопатією без лікування (ДР), з лікуванням інсуліном (Інсулін) та інгібітором протеїнази (ІПК) сорафенібом (Інсулін+ІПК): а — репрезентативні блотограми NF-H і актину; б — результати денситометричного аналізу блотограм NF-H на рівні 200 і 500 kDa (співвідношення до вмісту актину); * — $P < 0,05$ порівняно зі значенням на початку дослідження

кої протяжності у шарі нервових клітин (білі стрілочки на рис. 2). Інтенсивність їх забарвлення за шкалою D. Dabbs відповідала 2–3 балам. Також чітко візуалізувалися нервові волокна та їхні сплетення у зовнішньому плексиформному шарі (білі зірочки на рис. 2) і на межі зовнішнього ядерного шару та шару паличок і колбочок (білі ромбики на рис. 2). Позитивно забарвлені волокна у плексиформних шарах сітківки могли належати горизонтальним та амакриновим клітинам [22].

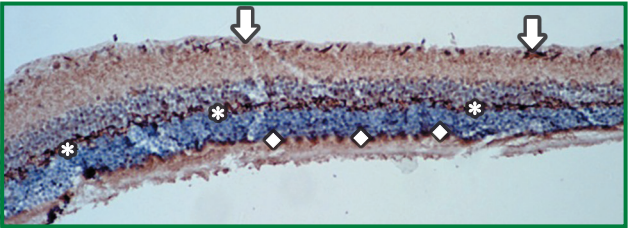


Рисунок 2. Сітківка інтактного щура. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження нейрофіламентів (NF-H), дозabarвлення гематоксиліном; *100; білі стрілочки — позитивно забарвлені гангліонарні клітини; білі зірочки — інтенсивне забарвлення сплетень волокон у зовнішньому плексиформному шарі; білі ромбики — інтенсивне забарвлення сплетень волокон на межі зовнішнього ядерного шару та шару паличок і колбочок

Через 3 місяці моделювання ДР інтенсивність імуно-позитивного забарвлення сітківки була суттєво знижена та за шкалою D. Dabbs відповідала 1 балу (рис. 3а). Рідкі гангліонарні клітини мали NF-H-позитивне забарвлення (білі стрілочки на рис. 3а і 3б). У зовнішньому плексиформному шарі інтенсивність забарвлення також була знижена, тоді як на межі зовнішнього ядерного шару та шару паличок і колбочок NF-H-позитивне забарвлення не визначалося. Подекуди в шарі нервових волокон зберігалися інтенсивно забарвлені сплетення волокон, переважно навколо розширених капілярів (біла стрілочка на рис. 3с).

У групі з введенням інсуліну інтенсивність NF-H-позитивного забарвлення була вищою (3–4 бали), ніж у групі без лікування (рис. 4а). Можна було ідентифікувати позитивно забарвлені волокна у внутрішньому плексиформному шарі, переважно поблизу внутрішнього ядерного шару, що відповідало морфології та розташуванню горизонтальних клітин [22]. У зовнішньому ядерному шарі чітко ідентифікувалися з інтенсивністю забарвлення до 2 балів сплетення нервових волокон, які відповідали морфології амакринових клітин. Як і в контрольній групі, на межі зовнішнього ядерного шару та шару паличок і колбочок NF-H-позитивне забарвлення не визначалося.

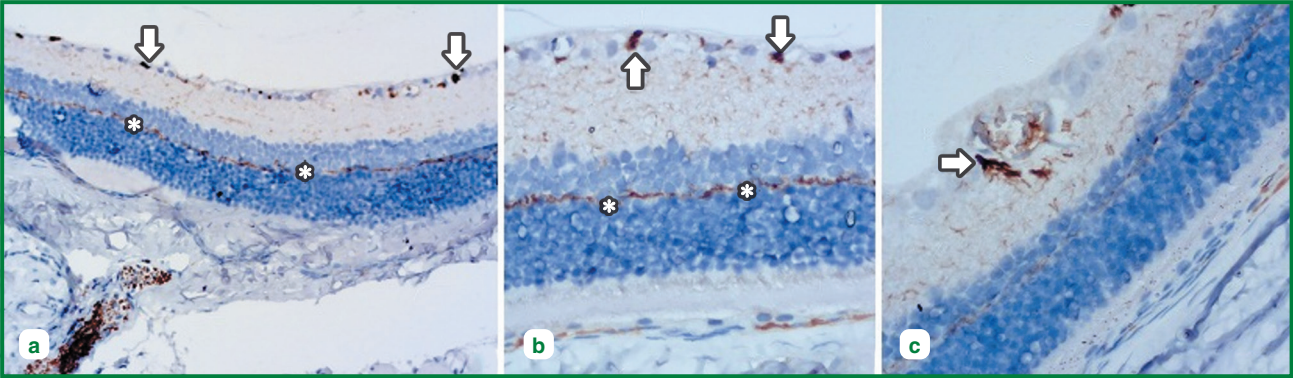


Рисунок 3. Сітківка щура з ДР, 3 місяці. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження нейрофіламентів (NF-H), дозabarвлення гематоксиліном; а *200; б, с *400; білі стрілочки на а і б — імуно-позитивні волокна у шарі гангліонарних клітин; білі зірочки на б — забарвлені волокна у зовнішньому плексиформному шарі; біла стрілочка на с — сплетення імунопозитивних волокон біля капіляра у шарі гангліонарних клітин

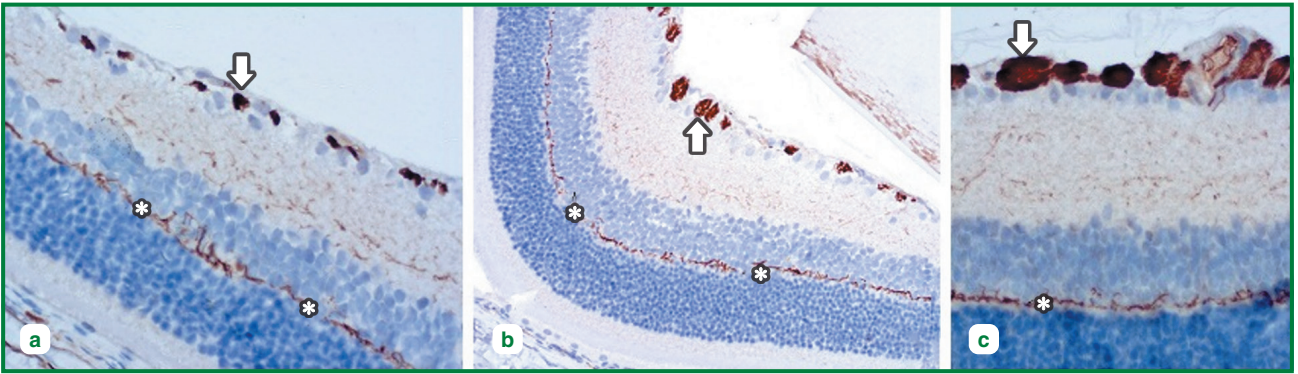


Рисунок 4. Сітківка щура з ДР, 3 місяці. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження нейрофіламентів (NF-H), дозабарвлення гематоксиліном; а, b $\times 200$; с $\times 400$; а — лікування інсуліном; b і с — лікування інсуліном і ІПК; білі стрілки на а і b — сплетення імунопозитивних волокон у шарі нервових волокон; білі зірочки на а, b і с — забарвлені волокна у зовнішньому плексиформному шарі; біла стрілочка на а — висока інтенсивність забарвлення у сплетеннях імунопозитивних волокон вздовж внутрішньої поверхні сітківки

У групі з введенням інсуліну і ІПК сорафенібу ці зміни також були відмічені, гангліонарні клітини та їхні аксональні горбки були інтенсивно забарвлені (до 3 балів; рис. 4b і 4c). Чітко візуалізувалися сплетення волокон горизонтальних і амакринових клітин.

Таким чином, встановлено, що вміст та інтенсивність забарвлення NF-H у тканинах сітківки при експериментальній ДР суттєво зменшувалися. Застосування ІПК сорафенібу певною мірою запобігало такому зменшенню та сприяло збереженню морфології NF-H-позитивних елементів сітківки — гангліонарних, горизонтальних та амакринових клітин.

Обговорення

У людини важкі нейрофіламенти (NF-H) мають масу, розраховану на основі послідовності ДНК, 112,5 kDa, у щурів — 117 kDa та 200–220 kDa — на основі електрофорезу в поліакриламідному гелі [23]. Їхня вища молекулярна маса *in vivo* та при електрофорезі пояснюється великою кількістю негативно заряджених амінокислот (глутамат) в їхніх послідовностях та посттрансляційними модифікаційними змінами. До функцій NF-H відносять підтримку та зміцнення цитоскелета нейронів і його структурну організацію, а також контроль за радіальним ростом і стабільністю аксонів, що забезпечує ефективну високошвидкісну нервову провідність [24]. Також повідомляється про їхню роль в синаптичній передачі нервових імпульсів, що забезпечує синаптичну пластичність ЦНС та соціальну пам'ять, довгострокову потенціацію гіпокампа [25]. Мережа NF взаємодіє з багатьма протеїнами і органелами нейронів, включаючи мітохондрії, актин, тубулін, мозковий спектрин, кінази, фосфатази, молекулярні двигуни, рецептори, протеази та інші деградаційні системи. Це необхідно для підтримки структурної і транспортної функції аксонів, накопичення і організації синаптичних везикул, розподілу мембранних білків ендосом і лізосом, ендоплазматичного ретикулу, регуляції функції мітохондрій [25].

Нами було виявлено суттєве зниження (у 2,2 раза порівняно з інтактним контролем; $p < 0,05$) NF-H у тканинах сітківки щурів при розвитку експерименталь-

ної ДР через 3 місяці спостереження. При аксональному пошкодженні, втраті аксонів, смерті нейронів унаслідок різних впливів, зокрема гіперглікемії, NF у значній кількості виділяються у кров і спинномозкову рідину [10]. Було повідомлено про кореляцію підвищених рівнів NF у сироватці крові та спинномозковій рідині з атрофією мозкової речовини при нейродегенеративних захворюваннях [26], а також з внутрішньою ретинальною атрофією [27]. Було запропоновано використовувати підвищені рівні NF-H у склистому тілі як маркер дегенерації сітківки, що ґрунтується на виході клітинспецифічних білків у суміжні компартменти при порушенні цілісності мембран нейронів [28]. Таким чином, підвищені рівні NF поза нервовою тканиною закономірно асоціюються зі зниженими їх рівнями в локусах синтезу і накопичення.

Крім того, при ДР на блотограмах відзначалися смужки в діапазоні 320 kDa, що відображали накопичення гіперфосфорильованих ланцюгів NF-H. NF-H поряд з NF-M інтенсивно фосфорильовується у хвостовій частині молекули, що підвищує його стійкість до протеаз [23]. Цей процес контролює зміни в пластичності синапсів, аксональний транспорт, нейрональну диференціацію, діаметр, елонгацію і мієлінізацію аксонів, відповіді імунної системи на аксональне пошкодження [11]. Фосфорильовання NF відбувається за рахунок активності протеїнкіназ (PKA, PKC — на N-кінці, p38 α , JNK1, JNK3, GSK-3 α , -3 β , CDK-5, ERK1/2 — на C-кінці) і різноманітних сигнальних молекул клітини, а також регулюється протеїнофосфатазами [29]. Надмірна активність протеїнкіназ, що спостерігається в умовах гіперглікемії, може призводити до гіперфосфорильовання NF-H, що, як вважається, є першопричиною агрегації NF та акумулювання цих молекул [20, 21, 30]. Гіперфосфорильовання може змінювати субодиниці NF з утворенням проміжних продуктів, які схильні до агрегації та неправильної зборки через модифіковані йонні зв'язки між субодиницями. Змінюються також зв'язки молекул NF з молекулярними моторами, що порушує аксональний транспорт NF. Гіперфосфорильовані NF захищені від протеаз, що сповільнює їхню деградацію в клітині через підвищену біохімічну стабільність. Між

молекулами NF можуть виникати аномальні зшивання, формуватися клубки [11].

При застосуванні інсуліну рівні NF-H у сітківці були зменшені такою ж мірою (у 2,0 раза; $p < 0,05$), що і в щурів без лікування, і це, таким чином, вказувало на відсутність впливу інсуліну на дегенерацію сітківки при ДР. Також не змінились рівні гіперфосфорильованих NF-H. Було встановлено, що застосування інсуліну не лише не викликало оборотного розвитку встановленої ДР, але й могло погіршувати її ступінь через осмотичний набряк сітківки при різкому зниженні сироваткової глюкози, а також внаслідок синергістичної взаємодії інсуліну та VEGF, що, як відомо, сприяє прогресуванню ДР [31].

Застосування разом з інсуліном ІПК сорафенібу сприяло збереженню експресії NF-H — порівняно з інтактним контролем він був зниженим меншою мірою (у 1,6 раза; $p < 0,05$), при цьому його вміст був більшим, ніж у групі з введенням тільки інсуліну ($p < 0,05$). Також не виявлялись гіперфосфорильовані фракції NF-H. Сорафеніб є інгібітором багатьох протеїназ і має протипухлинну активність [32]. Встановлено, що інгібування протеїназ може справляти позитивний ефект на прогресування ДР, що пов'язано з численними патогенетичними механізмами, у яких задіяні ці ферменти [13–18]. Відсутність гіперфосфорильованих фракцій NF-H у сітківці щурів при застосуванні сорафенібу також вказує на його прямий вплив на протеїнази, що фосфорильовують NF [29]. Крім цього, сорафеніб впливає також на інші [2–9] механізми нейродегенерації при ДР, оскільки, зокрема, має анти-VEGF-активність [32], на що вказує менш виражене зниження концентрації NF-H у сітківці при його застосуванні.

Окрім зовнішнього та внутрішнього ядерних шарів та шару гангліонарних клітин, у сітківці позитивно забарвлюються міченими анти-NF-H антитілами волокна в зовнішньому та внутрішньому плексиформних шарах, а також у шарі оптичних волокон. У плексиформних шарах волокна належать горизонтальним та амакриновим клітинам, у шарі оптичних волокон — аксонам гангліонарних клітин [22]. Також NF-H може використовуватись поряд з антигеном диференціації тимоцитів 1 (Thy-1), β -тубуліном та РНК-зв'язуючим протеїном з множинним сплайсингом (RBPMS) як маркер гангліонарних клітин у ході виявлення причин втрати зору при нейропатіях зорового нерва [33].

При ДР інтенсивність імунорезистивного NF-H-забарвлення сітківки була суттєво знижена в усіх її шарах, що корелювало з даними імуноблоту — це вказувало на те, що нейродегенерація з виходом NF-H поза межі клітин сітківки в таких умовах відбувалася рівномірно. Інтенсивно забарвлені сплетення волокон у шарі нервових волокон, що зберігались переважно навколо розширених капілярів, можуть бути агрегатами гіперфосфорильованих молекул NF-H у вигляді клубків, локалізованих в аксонах гангліонарних клітин [11, 22]. Дещо більш інтенсивне імунорезистивне забарвлення сітківки при застосуванні інсуліну також корелювало з даними імуноблоту, який показав менш виражене зниження концентрації NF-H у тканинах сітківки. При за-

стосуванні інсуліну з ІПК імунорезистивне забарвлення було ще більш вираженим, а також не спостерігались інтенсивно забарвлені сплетення навколо судин шару нервових волокон сітківки, які могли відповідати агрегатам гіперфосфорильованих молекул NF-H.

Висновки

1. Вміст NF-H у сітківці при розвитку експериментальної ДР суттєво зменшувався порівняно з інтактним контролем (у 2,2 раза; $p < 0,05$). Інтенсивність забарвлення NF-H-позитивних елементів сітківки (гангліонарні, горизонтальні та амакринові клітини та їхні відростки) також була зниженою.

2. Введення інсуліну супроводжувалося збільшенням порівняно з нелікованим контролем вмісту NF-H та інтенсивності специфічного забарвлення, що більшою мірою було виражено при комбінованому застосуванні інсуліну й ІПК сорафенібу.

3. Отримані результати та їх аналіз показали перспективність застосування блокади клітинних протеїназ, яка запобігала втраті нейрофіламентів та їхній більшій експресії нервовими елементами сітківки при ДР.

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

Інформація про фінансування. Фінансування відсутнє.

References

1. Ntikoudi M, Farmaki TM, Tziomalos K. Dopamine: A New Player in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy? *Int J Mol Sci*. 2024 Dec 8;25(23):13196. doi: 10.3390/ijms252313196.
2. Bianco L, Arrigo A, Aragona E, et al. Neuroinflammation and neurodegeneration in diabetic retinopathy. *Front Aging Neurosci*. 2022 Aug 16;14:937999. doi: 10.3389/fnagi.2022.937999.
3. 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 May 10;113(19):E2655–E2664. doi: 10.1073/pnas.1522014113.
4. Wang W, Lo ACY. Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Treatments. *Int J Mol Sci*. 2018 Jun 20;19(6):1816. doi: 10.3390/ijms19061816.
5. Tien T, Zhang J, Muto T, Kim D, Sarthy VP, Roy S. High Glucose Induces Mitochondrial Dysfunction in Retinal Müller Cells: Implications for Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017 Jun 1;58(7):2915–2921. doi: 10.1167/iovs.16-21355.
6. Sasaki M, Ozawa Y, Kurihara T, et al. Neurodegenerative influence of oxidative stress in the retina of a murine model of diabetes. *Diabetologia*. 2010 May;53(5):971–979. doi: 10.1007/s00125-009-1655-6.
7. Bek T. Diameter Changes of Retinal Vessels in Diabetic Retinopathy. *Curr Diab Rep*. 2017 Aug 8;17(10):82. doi: 10.1007/s11892-017-0909-9.
8. Callan A, Jha S, Valdez L, Tsin A. Cellular and Molecular Mechanisms of Neuronal Degeneration in Early-Stage Diabetic Retinopathy. *Curr Vasc Pharmacol*. 2024;22(5):301–315. doi: 10.2174/0115701611272737240426050930.
9. Reis A, Mateus C, Melo P, Figueira J, Cunha-Vaz J, Castelo-Branco M. Neuroretinal dysfunction with intact blood-retinal bar-

rier and absent vasculopathy in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2014 Nov;63(11):3926-3937. doi: 10.2337/db13-1673.

10. Gafson AR, Barthélemy NR, Bomont P, et al. Neurofilaments: neurobiological foundations for biomarker applications. *Brain*. 2020 Jul 1;143(7):1975-1998. doi: 10.1093/brain/awaa098.

11. Devarakonda SS, Basha S, Pithakumar A, et al. Molecular mechanisms of neurofilament alterations and its application in assessing neurodegenerative disorders. *Ageing Res Rev*. 2024 Dec;102:102566. doi: 10.1016/j.arr.2024.102566.

12. Li D, Mielke MM. An Update on Blood-Based Markers of Alzheimer's Disease Using the SiMoA Platform. *Neurol Ther*. 2019 Dec;8(Suppl 2):73-82. doi: 10.1007/s40120-019-00164-5.

13. Anwar S, Ahmed A, Sarli V, Hassan I. Editorial: Protein kinase inhibitors in neurodegeneration and cancer targeted therapies. *Front Cell Dev Biol*. 2024 Apr 18;12:1413293. doi: 10.3389/fcell.2024.1413293.

14. Ahmed T, Zulfiqar A, Arguelles S, et al. Map kinase signaling as therapeutic target for neurodegeneration. *Pharmacol Res*. 2020 Oct;160:105090. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105090.

15. Miller WP, Ravi S, Martin TD, Kimball SR, Dennis MD. Activation of the Stress Response Kinase JNK (c-Jun N-terminal Kinase) Attenuates Insulin Action in Retina through a p70S6K1-dependent Mechanism. *J Biol Chem*. 2017 Feb 3;292(5):1591-1602. doi: 10.1074/jbc.M116.760868.

16. Du Y, Tang J, Li G, et al. Effects of p38 MAPK inhibition on early stages of diabetic retinopathy and sensory nerve function. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Apr;51(4):2158-2164. doi: 10.1167/iovs.09-3674.

17. Li J, Chen K, Li X, et al. Mechanistic insights into the alterations and regulation of the AKT signaling pathway in diabetic retinopathy. *Cell Death Discov*. 2023 Nov 17;9(1):418. doi: 10.1038/s41420-023-01717-2.

18. Guan R, Kang Z, Li L, Yan X, Gao T. PIK3CA regulates development of diabetes retinopathy through the PI3K/Akt/mTOR pathway. *PLoS One*. 2024 Jan 9;19(1):e0295813. doi: 10.1371/journal.pone.0295813.

19. Dabbs DJ, editor. *Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications*. 6th ed. Oxford: Elsevier; 2021. 1000 p.

20. Schirmer L, Antel JP, Brück W, Stadelmann C. Axonal loss and neurofilament phosphorylation changes accompany lesion development and clinical progression in multiple sclerosis. *Brain Pathol*. 2011 Jul;21(4):428-440. doi: 10.1111/j.1750-3639.2010.00466.x.

21. De Paoli LF, Kirkcaldie MTK, King AE, Collins JM. Neurofilament heavy phosphorylated epitopes as biomarkers in ageing and neurodegenerative disease. *J Neurochem*. 2025 Feb;169(2):e16261. doi: 10.1111/jnc.16261.

22. 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.

23. Khalil M, Teunissen CE, Otto M, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat Rev Neurol*. 2018 Oct;14(10):577-589. doi: 10.1038/s41582-018-0058-z.

24. Barry DM, Stevenson W, Bober BG, et al. Expansion of neurofilament medium C terminus increases axonal diameter independent of increases in conduction velocity or myelin thickness. *J Neurosci*. 2012 May 2;32(18):6209-6219. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0647-12.2012.

25. 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.

26. Khalil M, Pirpamer L, Hofer E, et al. Serum neurofilament light levels in normal aging and their association with morphologic brain changes. *Nat Commun*. 2020 Feb 10;11(1):812. doi: 10.1038/s41467-020-14612-6.

27. Garzone D, Finger RP, Mauschitz MM, Santos MLS, Breteler MMB, Aziz NA. Neurofilament light chain and retinal layers' determinants and association: A population-based study. *Ann Clin Transl Neurol*. 2022 Apr;9(4):564-569. doi: 10.1002/acn3.51522.

28. Petzold A, Junemann A, Rejdak K, et al. A novel biomarker for retinal degeneration: vitreous body neurofilament proteins. *J Neural Transm (Vienna)*. 2009 Dec;116(12):1601-1606. doi: 10.1007/s00702-009-0316-8.

29. Petzold A. The 2022 Lady Estelle Wolfson lectureship on neurofilaments. *J Neurochem*. 2022 Nov;163(3):179-219. doi: 10.1111/jnc.15682.

30. Sihag RK, Inagaki M, Yamaguchi T, Shea TB, Pant HC. Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Exp Cell Res*. 2007 Jun 10;313(10):2098-2109. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.04.010.

31. Jingi AM, Tankeu AT, Ateba NA, Noubiap JJ. Mechanism of worsening diabetic retinopathy with rapid lowering of blood glucose: the synergistic hypothesis. *BMC Endocr Disord*. 2017 Oct 10;17(1):63. doi: 10.1186/s12902-017-0213-3.

32. Hasskarl J. Sorafenib: targeting multiple tyrosine kinases in cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2014;201:145-164. doi: 10.1007/978-3-642-54490-3_8.

33. Kwong JM, Caprioli J, Piri N. RNA binding protein with multiple splicing: a new marker for retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Feb;51(2):1052-1058. doi: 10.1167/iovs.09-4098.

Отримано/Received 09.05.2024

Рецензовано/Revised 25.07.2024

Прийнято до друку/Accepted 08.01.2025 ■

Information about author

Usenko Kateryna, PhD in Medicine, Department of Ophthalmology AGE 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. There was no external financial support during the realization of this research.

K.O. Usenko

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Effect of cellular protein kinase blockade on neurofilament expression in the retina during experimental diabetic retinopathy

Abstract. Background. Diabetic retinopathy (DR) is the main cause of vision loss among patients with diabetes mellitus. One of the key mechanisms of its progression is neurodegeneration, which is accompanied by a decrease in the level of neurofilaments (NF) in the retina. Cellular protein kinases are involved in the regulation of apoptosis and neurodegenerative processes in DR. The effect of their pharmacological blockade on the level of NF in the retina requires further study. The purpose is to determine the expression of neurofilaments in the retina in experimental diabetic retinopathy and the effect on it of pharmacological blockade of cellular protein kinases with sorafenib. **Materials and methods.** The study was performed on 55 three-month-old male Wistar rats. Experimental DR was modelled by administration of streptozotocin (50 mg/kg). Animals were divided into three groups: controls (no treatment), insulin group and group with combined administration of insulin and protein kinase inhibitor sorafenib (50 mg/kg). The content of NF-H in the retinal tissue was determined by immunoblotting,

and its expression — by immunohistochemical analysis. Statistical analysis was performed by ANOVA, differences at $p < 0.05$ were considered significant. **Results.** With the development of experimental DR, the level of NF-H in the retina decreased by 2.2 times ($p < 0.05$) compared to intact animals, indicating the development of neurodegeneration. Insulin administration had no effect on NF-H levels (2.0-fold decrease; $p < 0.05$), whereas the combined use of insulin and sorafenib contributed to its partial preservation (1.6-fold decrease; $p < 0.05$). In addition, sorafenib administration reduced neurofilament hyperphosphorylation, which could be related to its effect on protein kinase activity. **Conclusions.** Pharmacological blockade of cellular protein kinases with sorafenib partially prevents the loss of NF-H in the retina in experimental DR, indicating the prospects of this approach for the protection of neuronal structures from hyperglycemic damage.

Keywords: diabetic retinopathy; neurodegeneration; neurofilaments; cellular protein kinases; sorafenib