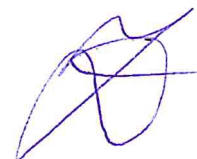


Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

ДЯКУН КАТЕРИНА ОЛЕГІВНА



УДК 616.379 – 008.64: 577.151.63 + 577.164.15

**МЕХАНІЗМИ ДІЇ ІНГІБІТОРІВ PARP-1 ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО
ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ**

03.00.04 – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття
наукового ступеня кандидата біологічних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі біохімії Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України та у відділі біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Кучмеровська Тамара Муратівна,
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України,
провідний науковий співробітник відділу біохімії вітамінів
та коензимів

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, доцент
Калачнюк Лілія Григорівна,
Національний університет біоресурсів і
природокористування України,
професор кафедри біохімії і фізіології тварин
імені академіка М.Ф. Гулого

доктор біологічних наук, професор
Коваленко Валентина Миколаївна,
ДУ «Інститут фармакології та токсикології» НАМН України
завідувач відділу токсикології

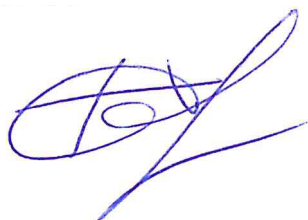
Захист відбудеться «08» лютого 2021 року о 14.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська 64/3, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», спеціалізована вчена рада Д 26.001.24

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58, зал № 12

Автореферат розісланий «05» січня 2021 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради



Н. Г. Ракша

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Цукровий діабет (ЦД) є багатofакторним метаболічним захворюванням, що досить часто супроводжується численними ускладненнями та становить на даний час одну з найважливіших ендокринних проблем, яка потребує науково-обґрунтованого вирішення. Станом на 2019 рік у світі зареєстровано близько 463 мільйонів хворих і за прогнозами їх кількість досягне 700 мільйонів до 2045 року [IDF Diabetes Atlas, 2019], у тому числі біля 1,5 мільйона в Україні, при цьому у 60 - 70 % хворих розвивається діабетична нейропатія.

Різні ендогенні (переважно генетичні) та екзогенні фактори можуть бути причиною виникнення ЦД та його ускладнень. Серед численних ускладнень ЦД на даний час значна увага приділяється з'ясуванню біохімічних механізмів, які лежать в основі розвитку діабетичної нейропатії (ДН), яка супроводжується порушенням провідності нервів, когнітивними та поведінковими розладами тощо. Більше того церебральні прояви цукрового діабету, як правило, розвиваються підступно, значною мірою незалежно від порушень метаболізму та судинних дисфункцій (таких як гострі гіпоглікемічні епізоди та інсульт), які негативно впливають на якість життя. Разом з тим діабет є фактором ризику виникнення хвороби Альцгеймера та Паркінсона, судинної деменції та інших, оскільки вважають, що порушення функцій у головному мозку за ЦД призводять до прискореного старіння [Vera Bril MD et al., 2018].

Однією із актуальних проблем сьогодення у дослідженні механізмів розвитку порушень функцій та регуляторних процесів в клітинах за ЦД та його ускладнень є з'ясування залучення процесів полі-АДФ-рибозилування протеїнів у поєднанні із іншими метаболічними процесами з метою їх корекції. Відомо, що полі(АДФ-рибозо)полімераза-1 (ПАРП-1) бере участь у ряді клітинних процесів включаючи відновлення одноланцюгових та дволанцюгових розривів ДНК шляхом ексцизійної репарації пошкоджених пуринових та піримідинових основ, ремодилуванні хроматину та апоптозі [Murthy P., 2019]. За ЦД та за його ускладнень розвивається оксидативний на нітрозативний стрес, що сприяє значному утворенню полі-АДФ-рибозильованих протеїнів, зниженню внутрішньоклітинного пулу АТФ та НАД⁺, що в свою чергу є однією із причин загибелі клітин шляхом некрозу [Vida A. et al., 2016]. Використання мишей з інактивованим геном *Parp-1* та дослідження інгібіторів ПАРП-1 продемонстрували нові дані щодо регулювання функцій клітин, а також були з'ясовані докази нетривіальних ефектів ПАРП-1, що на пряму не можуть бути пов'язані з процесами репарації ДНК [Jagtap P. et al., 2005]. Тому дослідження інгібіторів ПАРП-1, які можуть впливати на регулювання біохімічних процесів як центральної так і периферичної нервової системи відновлюючи функції клітин, сприятиме забезпеченню ефективного лікування та профілактики ЦД та його ускладнень.

Серед перспективних напрямків лікування ускладнень ЦД є розробка та синтез специфічних інгібіторів ПАРП-1, спектр дії яких поширювався б не тільки на процеси полі-АДФ-рибозилування.

У зв'язку з цим, для досліджень були вибрані структурно відмінні інгібітори ПАРП-1: 1,5-ізохіноліндіол (ІХД) та нікотинамід (НАМ), дія яких може

реалізуватися на рівні регуляції та нормалізації ряду патогенетичних механізмів індукованих ЦД, що сприятиме вирішенню актуальної медико-соціальної проблеми лікування цього захворювання та його ускладнень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано на базі кафедри біохімії ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України у рамках науково-дослідних тем «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (№ д/р 0111U004648, 2011-2015 рр.); «Механізми метаболічних процесів в організмі за умов патологічних станів» (№ д/р 0116U002527, 2016-2018 рр.) та у відділі біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України у рамках науково-дослідної теми «Роль вітамінів А, Е, В₁, РР, ДЗ, убіхінону та їх коферментів у забезпеченні функціонування спеціалізованих клітин за норми та за умов ініціації їх загибелі» (№ д/р 0112U002625, 2012-2016 рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було дослідити механізми дії інгібіторів полі(АДФ-рибозо)полімерази-1 1,5-ізохіноліндіолу та нікотинаміду за експериментального цукрового діабету 1 типу.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. З'ясувати ефект 1,5-ізохіноліндіолу та нікотинаміду за їх обраних доз на рівень гіперглікемії на фоні змодельованого ЦД 1 типу;
2. Визначити рівень про-/антизапальних цитокінів у сироватці крові діабетичних щурів та за введення на його фоні 1,5-ізохіноліндіолу або нікотинаміду;
3. Оцінити експресію гену *Parp-1* у головному мозку щурів за експериментального ЦД 1 типу та за введення 1,5-ізохіноліндіолу або нікотинаміду;
4. Оцінити вплив 1,5-ізохіноліндіолу та нікотинаміду на вміст полі-АДФ-рибозилуванних протеїнів та фрагментацію ПАРП-1 у головному мозку щурів за експериментального ЦД 1 типу.
5. Визначити вміст колагену типу I у великогомілкових та малоогомілкових кісток та з'ясувати залежність його вмісту від концентрації вітамінів С, Е та В₃ у сироватці крові та печінці діабетичних щурів та за введення на його фоні нікотинаміду.

Об'єкт дослідження. Експериментальний цукровий діабет 1 типу за умов введення інгібіторів полі(АДФ-рибозо)полімерази-1 1,5-ізохіноліндіолу та нікотинаміду.

Предмет дослідження. Ключові молекулярні та біохімічні процеси у головному мозку, великогомілкових та малоогомілкових кісток за експериментального ЦД 1 типу та за умов введення інгібіторів ПАРП-1.

Методи дослідження. У роботі використано спектрофотометричний метод (визначення вітамінів С, В₃, Е, концентрації білків, вмісту НАД⁺, лужної фосфатази), полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) (оцінки рівня експресії гену *Parp-1*), радіоізотопний метод (визначення активності полі(АДФ-рибозо)полімерази-1), метод тонкошарової хроматографії (розділення α -токоферолу), метод рідинної хроматографії (визначення амінокислотного складу), метод протокової цитометрії (визначення життєздатності та перерозподілу лейкоцитів, АФК, цитокінів), вестерн-

блот аналіз (рівень полі-АДФ-рибозильованих протеїнів, SIRT1, CYP 2E1), електрофоретичне визначення рівня фрагментації молекули ПАРП-1 та статистичні методи досліджень.

Наукова новизна одержаних результатів. На моделі експериментального цукрового діабету 1 типу було встановлено, що НАМ та ІХД здатні проявляти коригуючу дію на вміст полі-АДФ-рибозильованих ядерних протеїнів, активність ПАРП-1 та фрагментацію ензиму, а також на експресію гену *Parp-1* у мозку щурів. Виявлено, що за ЦД 1 типу відбувається інтенсифікація оксидативного стресу, підтвердженням чого є підвищення вмісту АФК в лейкоцитах крові та їх субтипах, що свідчить про порушення функцій цих клітин імунної системи. Це супроводжується розвитком запальних процесів, підтвердженням чого було підвищення вмісту прозапальних цитокінів. Введення НАМ призводило до пригнічення розвитку оксидативного стресу та зниження цитокіну інтерлейкіну-4, вміст якого був підвищений за ЦД 1 типу. Продемонстровано, що НАМ підвищував експресію протеїну СІРТ-1, тим самим запобігаючи розвитку нейродегенеративних процесів. Вперше виявлено, що патологічні порушення функцій мозку за ЦД відбуваються на тлі периферичної діабетичної нейропатії. Доказом цього є зниження вмісту колагену типу I у тканинах великогомілкових та малогомілкових кісток, що може бути зумовлено як структурною перебудовою колагену так і його модифікаціями, як результат змін як його амінокислотного складу так і вмісту вітамінів С, В3 та Е в сироватці крові тварин, вітамінів, які залучені та впливають на синтез колагену. Вперше показано що за введення НАМ вміст колагену у досліджуваних тканинах великогомілкових та малогомілкових кістках щурів підвищувався за експериментального ЦД 1 типу. Використані інгібітори ПАРП-1 проявляють коригувальний ефект на процеси полі-АДФ-рибозильовання та експресію гену *Parp-1* та протеїну СІРТ-1 у головному мозку тварин, а також на вміст колагену у тканинах кісток за ЦД 1 типу.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати свідчать про доцільність використання інгібіторів процесів полі-АДФ-рибозильовання у запобіганні розвитку та виникнення ускладнень ЦД, а також його ефективного лікування та поглиблюють сучасні уявлення щодо процесів полі-АДФ-рибозильовання у патогенезі ЦД. Проведені дослідження можуть слугувати підґрунтям для подальших доклінічних досліджень та сприяти пошуку нових терапевтичних підходів для запобігання виникненню порушень у клітинах, тканинах та органах індукованих ЦД та його ускладненнями, зокрема діабетичною нейропатією.

Одержані дані використовуються у навчальному процесі та науковій роботі кафедри біоорганічної та біологічної хімії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

Особистий внесок здобувача. Усі наукові результати дисертаційної роботи отримано автором самостійно або за його безпосередньої участі. Дослідження процесів полі-АДФ-рибозильовання у мозку щурів проведено спільно із к.б.н. Гузиком М.М.

Розробка загальної концепції дисертаційної роботи, аналіз результатів та їх узагальнення, формулювання основних положень і висновків, підготовка до друку наукових статей здійснено спільно із науковим керівником дисертаційної роботи д.б.н., проф. Кучмеровською Т.М. Автор також щиро вдячний усім співавторам публікацій за темою дисертації.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації були представлені на вітчизняних та міжнародних конференціях: XII Всеукраїнська наукова конференція студентів, аспірантів та молодих науковців (Київ, 2012), Міжнародна міждисциплінарна наукова конференція «Біологічно активні речовини і матеріали: фундаментальні та прикладні питання отримання та застосування» (Новий Світ, 2012), Дванадцяті Данилевські читання науково-практичної конференції «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології» (Харків, 2013), науково-практична конференція «Сучасні проблеми біологічної хімії» (Харьків, 2013), Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії проблеми сучасної біохімії та клітинної біології” (Дніпропетровськ, 2015), 8th Annual meeting of the diabetes & cardiovascular disease (Мюнхен, Німеччина, 2015), 9th Annual meeting of the diabetes & cardiovascular disease (Париж, Франція, 2016), 4-та Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Хімія природних сполук» (Тернопіль, 2016), Вісімнадцяті Данилевські читання науково-практичної конференції «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології» (Харків, 2019), 32nd European College of Neuropsychopharmacology Congress (Копенгаген, Данія, 2019), XII Український біохімічний конгрес (Тернопіль, 2019), ECNP Workshop for Early Career Scientists in Europe (Ніцца, Франція, 2020), ECNP Workshop for Early Career Scientists in Europe (Відень, Австрія, 2020).

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 8 статей у фахових виданнях затверджених переліком МОН України та у міжнародних періодичних виданнях (5 публікацій у виданнях, включених до міжнародної наукометричної бази Scopus) та 16 тез доповідей у збірниках матеріалів конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів та їх обговорення, які викладено у трьох розділах, висновків та списку використаних джерел (244 найменувань). Роботу викладено на 145 сторінках друкованого тексту та проілюстровано 31 рисунками і 2 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводили на моделі експериментального ЦД 1 типу у щурів лінії Вістар (масою 240 ± 12 г), який індукували шляхом одноразового введення стрептозотоцину (СТЗ, Sigma, США) внутрішньочеревно у дозі 70 мг/кг маси тіла. Після десяти тижнів тварини були поділені на 4 групи: контрольна група, діабетична група та діабетична група щурів яким вводили НАМ або ІХД у дозі 5 мг/кг та 100 мг/кг відповідно протягом 14 діб. Утримання тварин та робота з ними

здійснювались у відповідності до міжнародних прийнятих правил проведення робіт з експериментальними тваринами згідно до відповідних національних та міжнародних положень стосовно проведення експериментальних робіт (Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986); Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження № 3447-IV», 2006).

Для дослідження використовували головний мозок, печінку, великогомілкові та малоогомілкові кістки, ізольовані лейкоцити, сироватку крові. Рівень глюкози крові визначали глюкометром «Accu-check» (Roshediagnosics, Швейцарія). В день експерименту у піддослідних тварин отримували сироватку крові центрифугуванням цільної крові та лейкоцити з периферичної крові після гемолізу еритроцитів. Оцінку вмісту цитокінів у сироватці крові досліджуваних щурів проводили з використанням мультиплексного набору Rat Cytokines 6plex FlowCytomix Multiplex (eBioscience, США) за допомогою протокового цитофлуориметру Coulter Epics XL (Beckman Coulter, США). Супероксиддисмутазну активність визначали спектрофотометрично у сироватці крові щурів згідно методу [Sun Y., 1988].

Активність полі(АДФ-рибозо)полімерази визначали з використанням $8\text{-}^{14}\text{C}$ -НАД⁺ відповідно методу [Tanigawa Y. et al., 1976]. Рівень НАД⁺ у головному мозку щурів та розрахунок співвідношення НАД⁺/НАДН проводили згідно методу [Williamson D. H. et al., 1967].

Вестерн-блот аналіз білків проводили згідно методів [Laemmli U.K., et al., 1970; Andres M.M., et al., 2004]. Денситометричний аналіз проведено за допомогою програмного забезпечення TotalLab TL120 (Nonlinear Inc, США), вміст протеїну представлено в умовних одиницях (ум. од.). Концентрації білків визначали за стандартним методом [Bradford M.M., 1976; Pace C. et al., 1995].

Визначення експресії гену *Parp-1* у головному мозку щурів проведено за допомогою полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі із зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Результати аналізу розраховували за допомогою спеціалізованої комп'ютерної програми "Differential expression calculator".

Виділення та очищення колагену типу 1 з великогомілкових та малоогомілкових кісток піддослідних тварин проводили згідно методів [Trelstad R. L., et al., 1976, Miller E. J., et al., 1982, Rajan N., et al., 2006]. Визначення амінокислотного складу отриманого колагену 1 типу проводили за допомогою іонообмінної хроматографії методом постколоночної дериватизації амінокислот нінгідрином на автоматичному аналізаторі ААА-881 (Чехія).

Достовірність розходжень між групами порівняння оцінювали методом однофакторного дисперсійного аналізу (one way ANOVA) з наступним тестом Bonferroni (post-hoc test). Результати представлені у вигляді середнього значення (M) та стандартної похибки середнього значення ($\pm m$). Різницю вважали статистично достовірною при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

ЦД, як гетерогенне захворювання, супроводжується численними ускладненнями. Порушення вуглеводного обміну, зокрема метаболізму глюкози, призводить до зростання концентрації глюкози у крові, що викликає розвиток цілого каскаду патологічних процесів.

Для того щоб переконатися, що у діабетичній групі розвивається діабет доцільним було оцінити рівень глюкози в крові всіх досліджуваних тварин. В результаті вимірювання концентрації глюкози було встановлено зростання її концентрації в крові діабетичної групи тварин після 12 тижнів, яка підвищувалася у 3,5 рази у порівнянні з тваринами контрольної групи, табл. 1. За цих умов також знижувалася маса тіла діабетичних тварин на 30 %. Зниження маси тіла тварин та підвищення концентрації глюкози свідчить про відтворення експериментальної моделі ЦД.

Введення досліджуваних препаратів НАМ або ІХД не призводило до зростання маси тіла тварин, а також ці сполуки не знижували рівень глюкози у крові. У контрольній групі щурів концентрація глюкози не змінювалася та залишилась на фізіологічному рівні $5,3 \pm 1,4$ ммоль/л.

Таблиця 1

Маса тіла та концентрація глюкози в крові щурів за експериментального ЦД 1 типу та за введення НАМ або ІХД ($M \pm m$, $n=6$)

Групи	Маса тіла (г)			Глюкоза в крові (ммоль/л)		
	Початкова	В кінці 10-го тижня	В кінці 12-го тижня	Початкова	В кінці 10-го тижня	В кінці 12-го тижня
Контроль	240±12	353±15	378±23	5,2±0,4	5,1±1,8	5,3±1,4
Діабет (Д)	242±9	258±13*	263±21*	8,4±0,9**	19,7±2,1*	19,3±2,2*
Д + ІХД	239±10	256±11*	223±11#,*	8,7±0,8**	19,7±2,1*	18,7±1,5*
Д + НАМ	240±9	257±10*	286±15*	9,2±0,7**	19,7±2,1*	18,2±1,8*

Примітка: **глюкоза крові через 48 годин після введення стрептозотоцину

* $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»;

$P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет»

На фоні підвищеної концентрації глюкози в крові, погіршується її засвоєння інсулінчутливими тканинами, що в свою чергу може призводити до інтенсифікації утворення активних форм кисню (АФК) та розвитку оксидативного стресу (ОС). Так, було виявлено, що рівень АФК у лейкоцитах крові діабетичних щурів був вищим на 75 % у порівнянні із контрольною групою (рис. 1). При цьому, введення НАМ або ІХД призводило до зниження рівня АФК в лейкоцитах на 25 % або 12 % відповідно, відносно діабетичної групи.

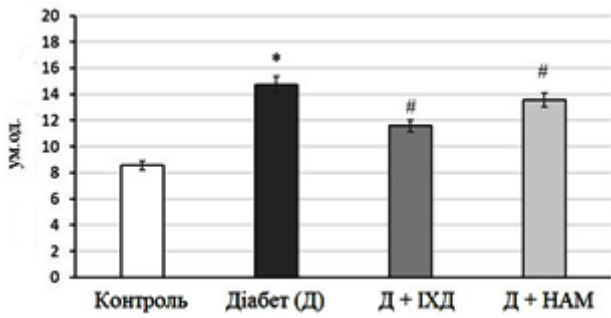


Рис. 1. Рівень АФК у лейкоцитах крові за експериментального ЦД 1 типу та на фоні введення НАМ та ІХД, (n = 5). *P<0,05 порівняно з групою «Контроль»;# P<0,05 порівняно з групою «Діабет»

значного зниження кількості живих клітин у крові тварин у порівнянні з контрольною групою, не виключено, що за рахунок пошкодження їх мембрани та розвитку апоптозу. При цьому інгібітори ПАРП-1 запобігали загибелі досліджуваних клітин крові, причому ІХД справляв більш виражений ефект на життєздатність клітин у порівнянні з НАМ (дані не представлено).

Відомо, що підвищений рівень глюкози спричинює пригнічення активності імунної системи, через це пацієнти, хворі на цукровий діабет, перебувають у групі ризику до інфекційних захворювань, причому цей ризик посилюється за наявності серцевосудинних ускладнень [Bertoni A. G., et al., 2001].

В організмі гомеостаз глюкози за ЦД також може порушуватися при підвищенні вмісту прозапальних цитокінів у кровотоці [Greenberg A.S. et. Al., 2002]. У здорових людей вміст цитокінів виявляється лише в слідових кількостях, проте цитокіни

За даних експериментальних умов, нами були виявлені суттєві зміни у перерозподілі між двома основними типами лейкоцитів. А саме, кількість гранулоцитів у крові тварин за ЦД 1 типу збільшувалась. Після введення діабетичним щурам ІХД спостерігали відновлення рівноваги між кількістю гранулоцитів та агранулоцитів, в той час як за введення нікотинаміду було виявлено лише часткове відновлення стану рівноваги цього параметру. При оцінці життєздатності лейкоцитів периферичної крові щурів показано, що розвиток ЦД 1 типу призводив до

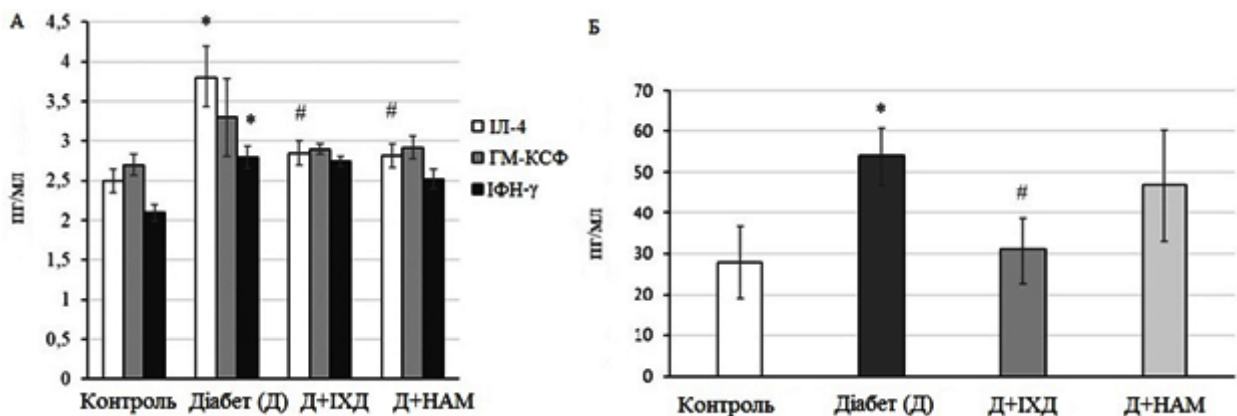


Рис. 2. Вміст інтерлейкіну-4 (ІЛ-4), гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактору (ГМ-КСФ), гамма-інтерферону (ІФН-γ) (А) та концентрація моноцитарно-хемотаксичного протеїну-1 (МХП-1) (Б) в сироватці крові щурів за експериментального ЦД 1 типу та на фоні введення НАМ та ІХД. *P<0,05 порівняно з групою «Контроль»; # P<0,05 порівняно з групою «Діабет»

проявляють біологічну активність і в дуже низьких концентраціях. Їх біологічний ефект опосередкований наявністю специфічних високоафінних рецепторів зовні на цитоплазматичній мембрані клітин. Утворення і секреція цитокінів відбувається короткочасно і чітко регулюється. При визначенні вмісту ІЛ-4 в сироватці крові щурів нами виявлено підвищення його вмісту в 1,55 рази за ЦД 1 типу (рис. 2).

Це може відбуватися завдяки тому, що ІЛ-4 має здатність проявляти не тільки протизапальну дію, але й антиоксидантну дію за тривалого перебігу захворювання, таким чином відображати відповідь організму на дію стресу. Більше того, ІЛ-4 є антагоністом гамма-інтерферону (ІФН- γ), що продукується Т-клітинами (CD_8) при потраплянні інфекції, а також підтипом CD_4 -клітин при розвитку запальних процесів за цукрового діабету. Вміст ІЛ-4 та ІФН- γ за експериментального цукрового діабету 1 типу зростає на 52 % та 26 % відповідно. Не було виявлено вірогідних змін концентрації гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактору (ГМ-КСФ), що є фактором росту, який стимулює функціональну активність нейтрофілів, еозинофілів і моноцитів та може продукуватися у різних типах тканин. Оскільки, як відомо моноцитарний хемотаксичний протеїн-1 (МХП-1) експресується переважно макрофагами у відповідь на дію цитокінів, важливо було оцінити його вміст за експериментального діабету. Було виявлено, що за ЦД 1 типу концентрація МХП-1 у сироватці крові зростає за ЦД 1 типу до $52,92 \pm 6,68$ пг/мл порівняно із $28,7 \pm 8,12$ пг/мл у групі контрольних тварин (рис. 2). Введення ІХД призводило до нормалізації вмісту МХП-1 до рівня контролю, у той час як дія NAM була менш вираженою. Виявлені зміни у вмісті ІЛ-4, ГМ-КСФ, ІФН- γ та МХП-1 можуть відбуватися не лише за рахунок запальних процесів індукованих ЦД, але і за рахунок впливу інших індукторів, серед яких є алергени, токсини, бактерії, віруси та продукти їх життєдіяльності. Таким чином, визначення вмісту цитокінів дозволяє оцінити інтенсивність запальних процесів та функціональну активність різних типів імункомпетентних клітин.

Експериментальні дослідження демонструють, що підвищення активності полі-АДФ-рибозилування протеїнів відіграє ключову роль у розвитку діабетичної

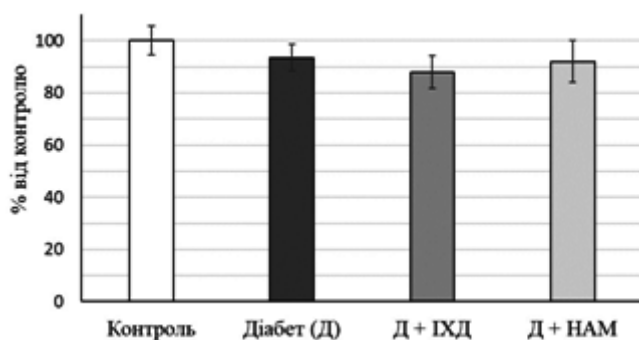


Рис. 3. Експресія гена *Parp-1* в головному мозку щурів за експериментального ЦД 1 типу та на фоні введення НАМ та ІХД

нейропатії, а модулювання даного процесу може стати новим підходом у лікуванні та профілактиці ускладнень ЦД. Крім того, питання щодо зв'язку між дисфункціями головного мозку за цукрового діабету та змінами в процесах полі-АДФ-рибозилування протеїнів все ще залишається відкритим. Раніше нами було показано, що ЦД 1 типу у щурів супроводжується оксидативним стресом у головному мозку та надактивацією полі-АДФ-рибозилування ядерних протеїнів у відповідь на пошкодження ДНК

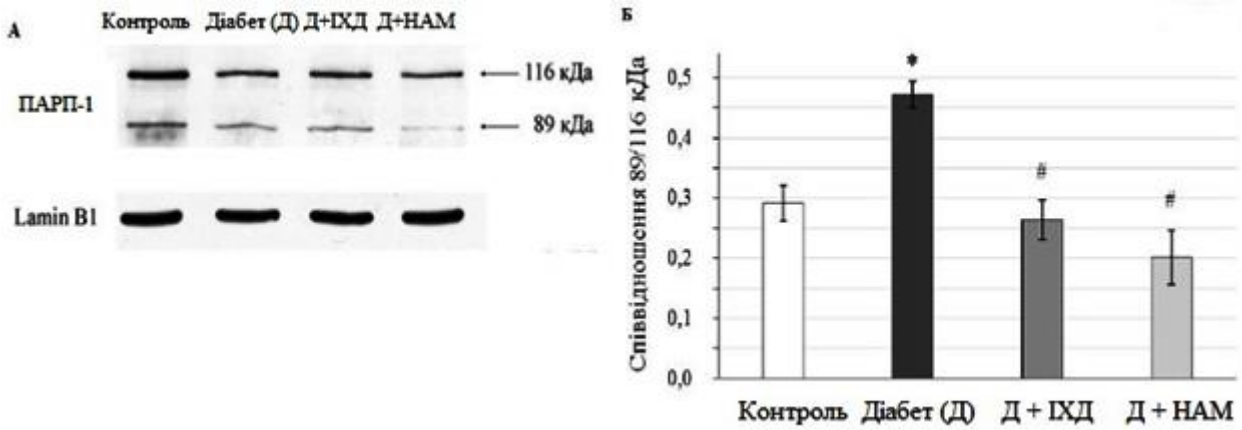


Рис. 4. Вестерн-блот аналіз фрагменту (89 кДа) та цілої молекули PARP-1 (116 кДа) в ядерній фракції головного мозку щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б), $M \pm m$ ($n = 4-5$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет»

[Kuchmerovska T.M. et al., 2004]. Продовжуючи ці дослідження, оцінювали перебіг процесів полі-АДФ-рибозилування протеїнів у мозку за умов ЦД 1 типу, для з'ясування можливих його зв'язків із іншими НАД-залежними процесами.

Представлені на рис. 3 дані, свідчать про те, що досліджувані інгібітори PARP-1 не впливали на експресію мРНК гену *Parp-1*, тобто не призводять до інтенсифікації або пригнічення синтезу PARP-1, що не виключає їх впливу на інших етапах біосинтезу ензиму.

За практично однакової експресії PARP-1, ЦД 1 типу на пізніх його етапах призводить до розвитку апоптотичних процесів, свідченням чого є збільшення співвідношення вмісту фрагменту 89 кДа до цілої молекули PARP-1 в мозку, що є доказом посилення протеолітичного розщеплення досліджуваного ензиму (рис. 4).

Підвищений вміст 89 кДа фрагменту PARP-1 зумовлений надактивацією даного ензиму та збільшенням вмісту полі-АДФ-рибозильованих протеїнів (ПАР) у головному мозку. Дійсно фрагментація PARP-1 супроводжується збільшенням вмісту рибозильованих протеїнів в екстрактах тканини мозку, про що свідчать дані представлені на рис. 5. Такі зміни можуть бути

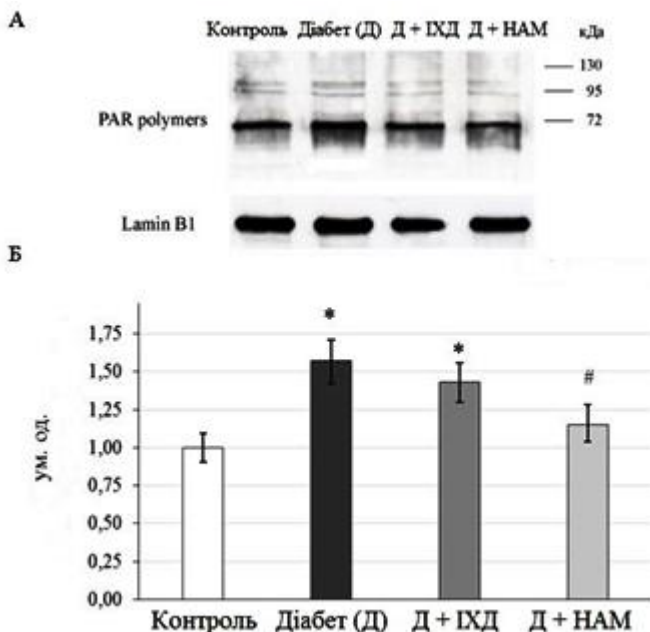


Рис. 5. Вестерн-блот аналіз полі-АДФ-рибозильованих протеїнів в ядерній фракції головного мозку щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б), ($M \pm m$, $n = 4-5$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет»

наслідком захисної реакції організму від надмірного вичерпання пулу АТФ та НАД⁺ у клітинах.

Отримані дані корелюють із активністю ПАРП-1 в ядерній фракції головного мозку щурів, яку визначали (рис. 6). За введення діабетичним щурам інгібіторів ПАРП-1 спостерігали зниження активності ензиму ПАРП-1 за їх впливу.

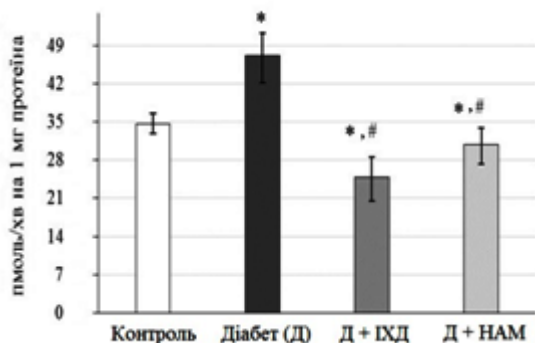


Рис. 6. Активність ензиму ПАРП-1 в ядерній фракції головного мозку щурів, $M \pm m$ ($n = 4-5$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет»

нами виявлено зміни вмісту СІРТ1 у клітинних ядрах головного мозку діабетичних щурів, що проявлялось зниженням його вмісту на 38 % у порівнянні з контролем, при цьому застосування НАМ підвищувало експресію протеїну СІРТ-1, тим самим запобігаючи розвитку нейродегенеративних процесів (рис. 7).

Вважають, що зростання активності СІРТ1 може призводити до продовження життя за рахунок його позитивного впливу на метаболічні процеси [Sato A. et al., 2010]. Виявлене зниження рівня експресії СІРТ1 за цукрового діабету 1 типу може свідчити про порушення його дії, як регулятора на посттрансляційну модифікацію протеїнів у відповідь на стресовий стан.

Оскільки ПАРП-1, а також СІРТ1 є НАД⁺-залежними ензимами, то цілком імовірно, що вони можуть конкурувати за доступність вільного НАД⁺ і тим самим призводити до зниження його вмісту у клітинах. Дійсно, було встановлено зниження вмісту НАД⁺ в головному мозку діабетичних щурів на

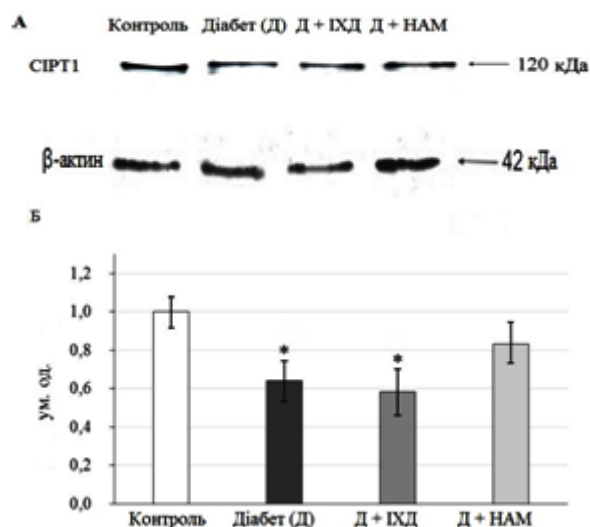


Рис. 7. Вестерн-блот аналіз деацетилази СІРТ1 в ядерній фракції головного мозку щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б), $M \pm m$ ($n = 4-5$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»

було встановлено зниження вмісту НАД⁺ в головному мозку діабетичних щурів на

36 % (рис. 8), що призводило до порушення рівноваги концентрацій вільних НАД⁺/НАДН у бік зменшення їх співвідношення до рівня 72,5 порівняно із 183,8 у контролі. При цьому введення ІХД або НАМ частково нормалізувало вміст НАД⁺ та підвищувало співвідношення вільних НАД⁺/НАДН в мозку щурів за ЦД 1 типу до рівня та 91,5 та 127,5 відповідно, що свідчить про те що введення НАМ проявляло більш виражену нормалізуючу дію.

Таким чином, інтенсифікація полі-АДФ-рибозилування ядерних протеїнів за ЦД

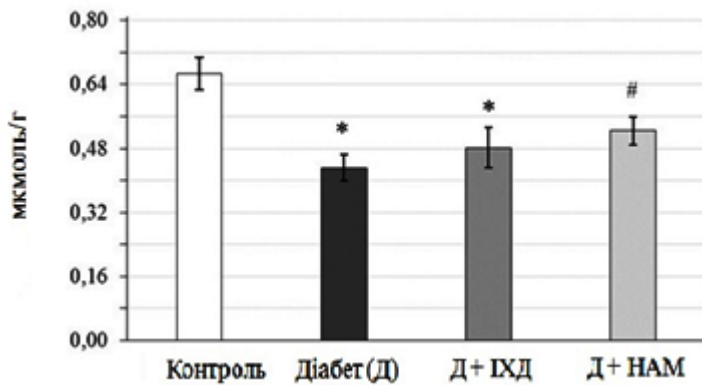


Рис. 8. Вміст НАД⁺ в головному мозку щурів за експериментального ЦД 1 типу та на фоні введення нікотинаміду та 1,5-ізохіноліндіолу, $M \pm m$ ($n = 6$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет».

багатьох тканинах та клітинах [Lehti T.M. et al., 2007]. Як відомо, за діабетичної нейропатії відбувається розростання сполучної тканини [Rosenbloom A.L., 2004] та знижується синтез колагену [Nieto N. et al., 2002]. Вважають, що у сполучній тканині виникнення остеопенії та зниження міцності кісток, які асоційовані з діабетом, можуть бути пов'язані в першу чергу із метаболізмом колагену типу I [Hamilton E.J. et al., 2009]. За ЦД може також порушуватися синтез колагену, який контролюється інсуліном на посттранскрипційному рівні [Thrailkill K.M. et al., 2005], а також на рівні експресії гену колагену $\alpha 2$

1 типу пов'язана із іншими НАД-залежними процесами. Використання інгібіторів ПАРП-1 має перспективу терапевтичного застосування для корекції ускладнень ЦД 1 типу, в тому числі процесів, пов'язаних із полі-АДФ-рибозилуванням.

У хворих на цукровий діабет можуть розвиватися різні патологічні ускладнення, передумовою виникнення яких є окислювальний стрес внаслідок тривалої гіперглікемії. За діабету на пізніх стадіях розвитку виникають структурні та функціональні зміни у протеїнах позаклітинного матриксу в

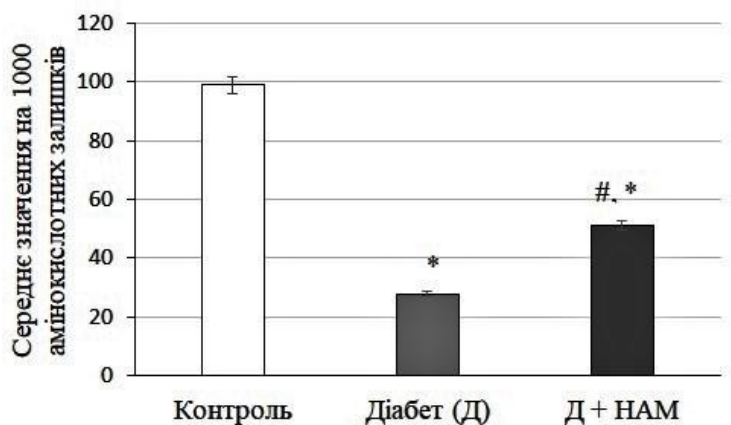


Рис. 9. Вміст гідроксипроліну в колагені типу I, виділеного з великогомілкової та малоюмілкової кісток щурів, за експериментального ЦД 1 типу та на фоні введення нікотинаміду ($n = 6$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет».

(I), який містить 2 функціональні промотори в клітинах та регується як на транскрипційному, так і на посттрансляційному рівнях [Rossert J. et al., 2006]. Не можна виключити можливості того, що саме зміни амінокислотного складу колагену кісток можуть призводити до розвитку периферичної діабетичної нейропатії.

Нами було виявлено значні відмінності в амінокислотному складі колагену типу I в кістках діабетичних тварин порівнянно з контрольними. Вміст гідроксипроліну, специфічного маркера колагенових протеїнів, який прямо корелює з вмістом колагену типу I великогомілкових та малоогомілкових кісток, був нижчим при ЦД та складав 27 % порівняно з контролем, а при введенні НАМ спостерігали зростання його вмісту до 49 % порівняно з контролем (рис. 9). Зміни в амінокислотному складі колагену типу I за ЦД головним чином стосувалися амінокислот, які як відомо, беруть участь у формуванні спіралі, поперечних зв'язок і заряду молекул цього протеїну. Так, у великогомілкових та малоогомілкових кістках щурів за ЦД 1 типу у колагені типу I спостерігали зниження вмісту гідроксилізіну на 44 %, гідроксипроліну на 73 %, проліну на 33 %, гліцину на 47 % та аланіну на

23 %, тобто саме тих амінокислот, зниження вмісту яких безпосередньо впливає на структуру спіралі, жорсткість і поперечні зв'язки колагену (дані не представлено).

За даних експериментальних умов, нами було виявлено збільшення вмісту лізину, гістидину, аргініну, аспарагінової кислоти, треоніну, серину, глутамінової кислоти, метіоніну, ізолейцину, лейцину, тирозину та фенілаланіну. Показано, що співвідношення Фішера, молярне співвідношення амінокислот з розгалуженим ланцюгом до ароматичних амінокислот (Лей + Іле + Вал / Тир + Фен) знижувалося до 63,6 % відносно контролю (рис. 10). Не дивлячись на те, що введення

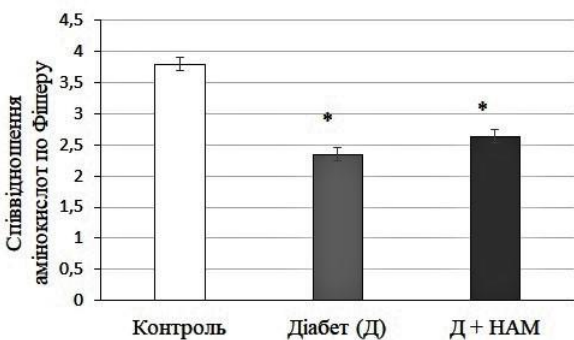


Рис. 10. Співвідношення амінокислот по Фішеру (Лей + Іле + Вал / Тир + Фен) у кістках щурів (n = 6). *P<0,05 порівняно з групою «Контроль»

НАМ призводило до часткового відновлення вмісту ряду амінокислот в колагені, а також в кістках щурів, НАМ не впливав на співвідношення Фішера. Нормалізуючий ефект НАМ також стосувався амінокислотних залишків, які могли б впливати на поверхневий заряд молекули колагену: аспарагінова кислота, треонін і серин. Разом з тим, вміст залишків проліну за дії НАМ лише частково відновлювався.

Важливу участь у біосинтезі колагену відіграють вітаміни С і Е, а L-аскорбінова кислота є кофактором посттрансляційної модифікації молекул колагену та залучена також до біосинтезу карнітину і нейротрансмітерів [Naidu K.A., 2003]. В результаті проведених досліджень було встановлено значне зниження вмісту вітамінів С і В₃ у сироватці крові та в печінці щурів (рис. 11) за ЦД, в той час як рівень вітаміну Е, найбільш поширеного і активного акцептору пероксильних радикалів, був збільшений. (рис. 11). Знижений вміст вітамінів С та В₃ у діабетичних щурів може бути пов'язано з їх надмірним використанням за інтенсифікації оксидативного стресу в тканинах діабетичних щурів, а також через

пригнічення НАДН-залежної регенерації вітаміну С. Після лікування НАМ (рис. 11) відновлювався вміст вітаміну В₃ та С у сироватці крові та печінці та у незначній мірі знижувався рівень α -токоферолу.

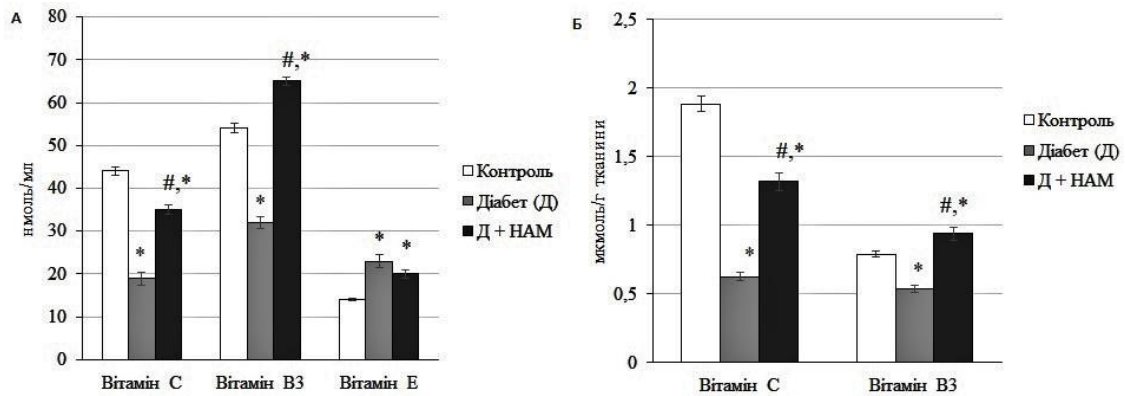


Рис. 11. Концентрація вітамінів С, В₃ та Е в сироватці крові щурів (А) та вміст вітамінів С та В₃ в печінці щурів (Б), $M \pm m$ ($n = 6$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет».

Дослідження амінокислотного складу колагену І типу у великогомілкових та малоогомілкових кістках щурів діабетичної групи та вмісту вітамінів залучених до синтезу колагену дають нову інформацію, яка, принаймні частково, може бути використана для ранньої діагностики розвитку діабетичної периферичної нейропатії.

Діабет індукував значне підвищення активності сироваткової лужної фосфатази порівняно з контрольною групою (рис. 12). Не дивлячись на те, що остаточна фізіологічна роль лужної фосфатази у метаболізмі кісткової тканини невідома, існують дані, які свідчать про участь цього ензиму у мінералізації та резорбції кісток [Seibel M.J., 2005]. Саме тому, підвищення активності лужної фосфатази виявлене нами за ЦД в сироватці крові може бути обумовлене появою ізоферментів лужної фосфатази [Golub E.E., et al., 2007]. Введення НАМ може частково відновлювати структуру колагену шляхом нормалізації вмісту вітаміну С, як показано на рис. 11, і зниження активності сироваткової лужної фосфатази, рис. 12.

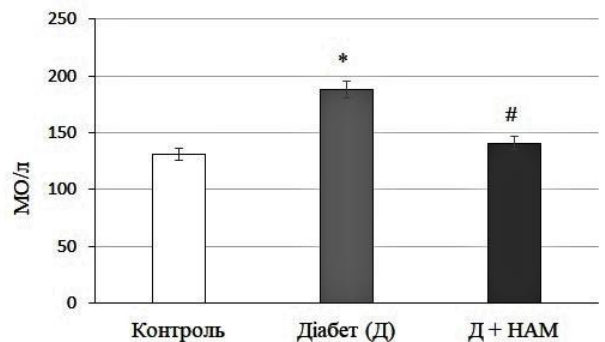


Рис. 12. Активність лужної фосфатази у сироватці крові щурів, $M \pm m$ ($n = 6$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет».

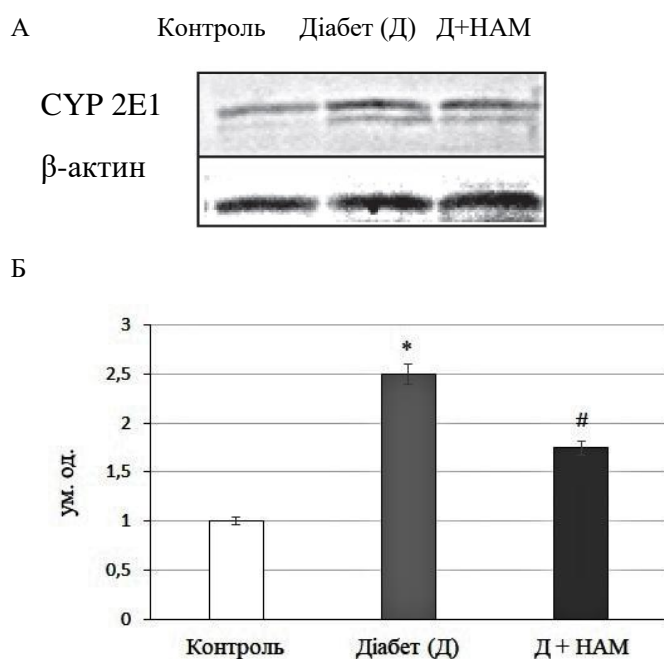


Рис. 13. Вестерн-блот аналіз протеїну СУР 2Е1 в печінці щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б), $M \pm m$ ($n = 6$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет».

процесів, зниження ступеня фрагментації молекули ПАРП-1, пригнічення активності полі-АДФ-рибозильованих протеїнів, підвищення вмісту СІРТ1, а також шляхом корекції структурних та метаболічних порушень колагену типу I досліджуваних кісток, тим самим запобігаючи розвитку ЦД та його ускладнень, зокрема діабетичної енцефалопатії та периферичної діабетичної нейропатії.

ВИСНОВКИ

Результати та узагальнення дослідження, отримані згідно поставленої мети дисертаційної роботи, поглиблюють існуючі теоретичні уявлення щодо механізмів дії інгібіторів ПАРП-1 (ІХД та НАМ) за експериментального цукрового діабету 1 типу та обґрунтовують можливість їх застосування для лікування діабетичної нейропатії.

1. Продемонстровано, що у діабетичних щурів за зниження життєздатності лейкоцитів, зміни співвідношення між їх типами розвивається оксидативний стрес та підвищується вміст цитокінів ІФН- γ , ІЛ-4, а також МХП-1 протеїну в сироватці крові як результат посилення прозапальних процесів. Встановлено, що інгібітори ПАРП-1, НАМ та ІХД у застосованих дозах частково відновлювали життєздатність лейкоцитів, рівновагу між їх типами, знижували рівень АФК та пригнічували розвиток запальних процесів.

2. Доведено, що за цукрового діабету 1 типу в ядрних фракціях головного мозку щурів підвищується активність ензиму ПАРП-1, що призводить до

Результати вестерн-блот аналізу (рис. 13) продемонстрували підвищення вмісту СУР 2Е1, одного із важливих індукторів окислювальних радикалів у клітинах, особливо за патологічних станів, зокрема ЦД, у 2,5 рази у печінці діабетичних щурів порівняно з контрольними. Не виключено, що підвищення рівня СУР 2Е1 у печінці діабетичних щурів може бути пов'язано з безпосереднім або опосередкованим підвищенням вмісту кетонів у плазмі крові. Зниження вмісту цього ензиму за введення НАМ може бути результатом як його антиоксидантної дії, так і антитоксичних властивостей.

Отже, механізми дії досліджуваних інгібіторів ПАРП-1 реалізуються через пригнічення оксидативного стресу та запальних процесів.

фрагментації ензиму та розвитку апоптотичних процесів. Вперше виявлено коригуючу дію ІХД та НАМ на ці показники.

3. Виявлено підвищення вмісту полі-АДФ-рибозильованих протеїнів в ядерних фракціях головного мозку діабетичних щурів та істотне зниження вмісту НАД-залежної ацетилази СІРТ-1 гістонів. Вперше встановлено нормалізуючу дію нікотинаміду та 1,5-ізохіноліндіолу за обраних доз на вміст полі-АДФ-рибозильованих протеїнів та нормалізуючу дію НАМ на рівень СІРТ-1.

4. За цукрового діабету 1 типу вміст вітамінів С та В₃, які безпосередньо або опосередковано залучені до біосинтезу колагену І типу, у сироватці крові та у печінці щурів знижувався, а вміст α -токоферолу зростав, при цьому нормалізуюча дія на ці показники встановлена лише при застосуванні нікотинаміду.

5. Вперше продемонстровано зниження рівня колагену типу І в великогомілкових та малогомілкових кістках діабетичних щурів, та виявлена нормалізуюча дія лише НАМ на вміст колагену та співвідношення Фішера, що запобігає розвитку периферичної діабетичної нейропатії.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Гузик М.М., Дякун К.О., Яніцька Л.В., Кучмеровська Т.М. Вплив інгібіторів полі(АДФ-рибозо)полімерази на деякі показники оксидативного стресу в лейкоцитах крові за стрептозотоцинового діабету у щурів. Український біохімічний журнал. 2013; 85(1):62-70. *(Особистий внесок здобувача – приймала участь у визначенні рівня АФК, життєздатності лейкоцитів, їх співвідношення, а також в оформленні статті).*

2. Гуріна Н.М., Шупрович А.А., Корпачева-Зінич О.В., Ховака В.В., Пентек Ю.Т., Гузик М.М., Дякун К.О., Кучмеровська Т.М. Стан обміну сечової кислоти та зміни рівня NAD⁺ у тканинах щурів за умови інсулінорезистентного синдрому, індукованого фруктозою. Ендокринологія. 2013; 11-17. *(Особистий внесок здобувача – визначала активність Na⁺, K⁺-АТР-ази, опрацьовувала дані та приймала участь в оформленні статті).*

3. Кучмеровська Т.М., Пентек Ю.Т., Донченко Г.В., Яніцька Л.В., Гузик М.М., Дякун К.О. Окислювальний стрес у серці щурів при експериментальному цукровому діабеті: ефект нікотинаміду. Доповіді Національної академії наук України. 2013; 8:176-181. *(Особистий внесок здобувача – приймала участь у визначенні ТБК-активних продуктів та оформленні статті).*

4. Guzyk M.M., Sergiichuk Iu.T., Dyakun K.O., Yanitska L.V., Kuchmerovska T.M. Effect of nicotinamide on amino acids content in bone collagen depending on biological availability of vitamins in diabetic rats. Ukrainian Biochemical Journal. 2014; 86(4):138-349. *(Особистий внесок здобувача – досліджувала амінокислотний склад колагену типу І, визначала концентрації вітамінів С, В₃ та альфа-токоферолу, лужної фосфатази, експресію СYP 2E1, та приймала участь в оформленні статті).*

5. Тихоненко Т., Дякун К., Сергійчук Ю. Мітохондріальна дегідрогеназна активність нервових закінчень мозку щурів. Вісник Львівського університету. Серія

біологічна. 2016; 73:203-207. *(Особистий внесок здобувача – приймала участь в визначенні мітохондріальної дегідрогеназної активності та оформленні статті).*

6. Guzyk M.M., Dyakun K.O., Yanytska L.V., Pryvrotska I.B., Pishel' I.M., Kuchmerovska T.M. Inhibitors of Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1 as Agents Providing Correction of Brain Dysfunctions Induced by Experimental Diabetes. *Neurophysiology*; 2017; 3(49):183-193. *(Особистий внесок здобувача – приймала участь у дослідженні цитокінового профілю, визначені експресії parg-1, визначені концентрації НАД+ та в оформленні статті).*

7. Guzyk M.M., Tykhonenko T.M., Dyakun K.O., Yanytska L.V., Pryvrotska I.B., Kuchmerovska T.M. Altered sirtuins 1 and 2 expression in the brain of rats induced by experimental diabetes and the ways of its correction. *Ukr. Biochem.* - 2019. – 91, No 1, P. 21-29. *(Особистий внесок здобувача – досліджувала експресію SIRT1, приймала участь в обробці даних та оформленні статті).*

8. Kuchmerovska T.M., Dyakun K.O., Guzyk M.M., Yanytska L.V., Pryvrotska I.B. Effect of a Combined Mitochondria-Targeted Treatment on the State of Mitochondria and Synaptic Membranes from the Brains of Diabetic Rats. *Neurophysiology*; 2019; 4(51): 234-247. *(Особистий внесок здобувача – визначала активність Na^+, K^+ -АТФ-ази, концентрацію НАД+ та експресію CYP 2E1, приймала участь в обробці даних та оформленні статті).*

9. Diakun K., Kuchmerovska T., Guzyk M., Yanitska I., Pentek I. The effect of poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors on diabetes-induced heart dysfunctions. 5th Annual meeting of the diabetes & cardiovascular disease Diabetes & Metabolism. 2012, 38, No 5, S102-S103.

10. Пентек Ю.Т., Ставнійчук Р.В., Яніцька Л.В., Гузик М.М., Дякун К.О., Кучмеровська Т.М. Вплив нікотинаміду на окислювальний стрес у серці щурів за цукрового діабету, індукованого стрептозотоцином. Матеріали науково-практичної конференції «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології». Дванадцяті Данилевські читання 14-15 березня 2013, Харків, С. 112-113.

11. Кучмеровська Т.М., Гузик М.М., Дякун К.О., Яніцька Л.В. Оксидативний стрес у лейкоцитах крові щурів за експериментального цукрового діабету: ефект інгібіторів полі(АДР-рибозо)полімерази. Матеріали науково-практичної конференції «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології». Дванадцяті Данилевські читання 14-15 березня 2013, Харків, С. 77 – 78.

12. Пентек Ю.Т., Дякун К.О., Попова А.В., Кучмеровська Т.М. Стан енергетичних процесів у різних тканинах щурів за умов інсулінрезистентного синдрому індукованого фруктозою. Матеріали XII Всеукраїнської наукової конференції студентів, аспірантів та молодих науковців. 14-16 листопада 2012, Київ, С. 37.

13. Пентек Ю. Т., Ставнійчук Р. В., Дякун К. О., Кучмеровська Т. М. Вплив комбінованого препарату з натуральних джерел на ГАМК-ергічну медіаторну систему за цукрового діабету 2-го типу у щурів. Матеріали Міжнародної міждисциплінарної наукової конференції «Біологічно активні речовини і матеріали:

фундаментальні та прикладні питання отримання та застосування». 27 травня – 1 червня 2013, Новий Світ, Україна, 2012, 2, С. 251-252.

14. Гузик М. М., Дякун К. О., Яніцька Л. В., Кучмеровська Т. М. Дослідження деяких показників оксидативного стресу в лейкоцитах крові щурів за умов впливу інгібіторів полі(ADP-рибозо)полімерази при експериментальному цукровому діабеті. Матеріали науково-практичної конференції «Сучасні проблеми біологічної хімії» Український біофармацевтичний журнал. 2013, 27, № 4, С. 15 – 16.

15. Тихоненко Т., Дякун К., Яніцька Л., Кучмеровська Т. Нейропротекторний вплив сумісної дії нікотинаміду, α -ліпоєвої кислоти та L-ацетил карнітину за експериментального цукрового діабету. Матеріали матеретьої міжнародної наукової конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”. Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології, 24-25 вересня 2015, Дніпропетровськ, С. 83 – 84.

16. Kuchmerovska Tamara, Sergiichuk Iuliia, Guzyk Mykhailo, Dyakun Kateryna, Tykhonenko Tetyana, Yanitska Lesya. Conjunction of mitochondrial targeting nutrients for the management of heart dysfunctions associated with type 2 diabetes 9th Annual meeting of the diabetes & cardiovascular disease. Diabetes & Metabolism, 2016, 42, 296–302.

17. Kuchmerovska Tamara, Guzyk Mykhailo, Kuklin Andrii, Tykhonenko Tetiana, Yanitska Lesya, Diakun Kateryna. Vitamin D as potential agent in the treatment of diabetes-induced inflammation and heart dysfunctions Diabetes Metabolism and the Heart. 2015, Band 24, N P 6. – P. 17 Pub.

18. Гузик М.М., Дякун К.О., Тихоненко Т.М., Яніцька Л.В., Кучмеровська Т.М. Вплив інгібіторів полі-ADP-рибозополімерази -1 (PARP-1) на клітини підшлункової залози лінії RINm5F. Матеріали 4-ої Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Хімія природних сполук». 2016, С.75-76.

19. Тихоненко Т.М., Гузик М.М., Дякун К.О., Кучмеровська Т.М. Вплив нікотинаміду та нікотиноїл-ГАМК на функціональний стан лейкоцитів за експериментального цукрового діабету Матеріали науково-практичної конференції «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології». Вісімнадцяті Данилевські читання 28 лютого - 1 березня 2019, Харків, С. 123 – 124.

20. Tykhonenko T., Tykhomyrov A., Guzyk M., Dyakun K., Kuchmerovska T. The effects of nicotinamide on the brain functional protein markers in prevention of diabetic neuropathy. 32nd ECNP Congress Copenhagen, Denmark 7-10 Sept, 2019, P. 834.

21. Yanitska L.V., Tykhonenko T.M., Guzyk, K. Dyakun, Pryvrotska I.V., Kuchmerovska T.M. Vitamin B3 and its derivative as agents in prevention of diabetes-induced peripheral neuropathy. Медична та клінічна хімія (Medical and Clinical Chemistry) UBC 30 Sept-4 Oct, Ternopil, 2019 т.21, №3, С.257.

22. Тихоненко Т.М., Тихомиров А.О., Гузик М.М., Дякун К.О., Кучмеровська Т.М. Зміни експресії ключових протеїнів мозку індуковані експериментальним цукровим діабетом 1 типу та можливість їх корекції. Медична та клінічна хімія (Medical and Clinical Chemistry) UBC 30 Sept-4 Oct, Тернопіль, 2019 т.21, №3, С.242.

23. Tykhonenko T., Tykhomyrov A., Guzyk M., Dyakun K., Kuchmerovska T. Effects of nicotinoyl gamma-aminobutyric acid on brain cytoskeleton and myelin basic protein levels in diabetic rats. Abstracts of the ECNP Workshop for Early Career Scientists in Europe, 5-8 March 2020, Nice, Pages S10-S11, P. 114.

24. Tykhonenko T., Tykhomyrov A., Guzyk M., Diakun K., Kuchmerovska T. The neuroprotective impact and action mechanisms of nicotinamide in the central nervous system dysfunction. Abstracts of the ECNP Workshop for Early Career Scientists in Europe, 12-15 September 2020, Vienna, Austria.

АНОТАЦІЯ

Дякун К.О. Механізми дії інгібіторів ПАРП-1 за експериментального цукрового діабету. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису. Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04–біохімія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2020.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню механізмів дії інгібіторів ПАРП-1 (1,5-ізохіноліндіолу та нікотинаміду) на процеси полі-АДФ-рибозилування у головному мозку щурів за експериментального цукрового діабету (ЦД) 1 типу. Виявлено коригуючу дію застосованих інгібіторів ПАРП-1 на процеси полі-АДФ-рибозилування ядерних протеїнів у мозку щурів на рівні їх вмісту, активності ПАРП-1 та фрагментації ензиму, а також на рівні експресії гену *Parp-1*. Встановлено, що за ЦД 1 типу відбувалась інтенсифікація оксидативного стресу, розвиток запальних процесів за яких введення нікотинаміду приводило до пригнічення розвитку оксидативного стресу та зниження рівня інтерлейкіну-4. На фоні інтенсифікації процесів полі-АДФ-рибозилування та зменшення вмісту НАД⁺ за ЦД 1 типу відбувалося зростання фрагментації ПАРП-1 та зниження рівня НАД-залежної деацетилази СІРТ1, що може характеризувати ступінь розвитку нейродегенеративних змін у мозку. Виявлено, що патологічні порушення функцій мозку за ЦД відбуваються на тлі периферичної діабетичної нейропатії. Доказом цього є зниження вмісту колагену у тканині великогомілкових та малоогомілкових кісток, що може бути зумовлено як структурною перебудовою колагену так і його модифікаціями, як результат змін його амінокислотного складу, а також змін вмісту вітамінів С, В3 та Е в сироватці крові тварин, вітамінів, які залучені та впливають на синтез колагену. Застосування інгібіторів ПАРП-1, як було встановлено впливають на досліджувані процеси та біохімічні показники, які зазнають змін за ЦД 1 типу шляхом принаймні часткової їх корекції.

Отримані дані свідчать про те, що за ЦД 1 типу існує зв'язок між процесом полі-АДФ-рибозилування у головного мозку щурів та іншими метаболічними процесами та показниками в організмі.

Ключові слова: полі-АДФ-рибозилування, інгібітори ПАРП-1, експериментальний цукровий діабет 1 типу, діабетична нейропатія, активні форми кисню, оксидативний стрес.

АННОТАЦИЯ

Дякун Е.О. Механизмы действия ингибиторов ПАРП-1 при экспериментальном сахарном диабете. – Квалификационная научная работа на правах рукописи. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04–биохимия. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, 2020.

Диссертация посвящена исследованию механизмов действия ингибиторов ПАРП-1 (1,5-изохинолиндиола и никотинамида) на процессы поли-АДФ-рибозилирования в головном мозге крыс при экспериментальном сахарном диабете (СД) 1 типа. Выявлено корректирующее действие примененных структурно-отличных ингибиторов ПАРП-1 на процессы поли-АДФ-рибозилирования ядерных протеинов в мозге крыс на уровне их содержания, активности ПАРП-1 и фрагментации энзима, а также на уровне экспрессии гена *Parp-1*. Установлено, что при СД 1 типа происходила интенсификация оксидативного стресса, подтверждением чего является повышение содержания АФК в лейкоцитах крови и их субтипов, что свидетельствует о нарушении функций этих клеток иммунной системы. Интенсификация оксидативного стресса сопровождалась развитием воспалительных процессов, подтверждением чего было повышение содержания провоспалительных цитокинов. Введение НАМ приводило к угнетению развития оксидативного стресса и снижения цитокина интерлейкина-4, содержание которого был повышен с СД 1 типа. На фоне интенсификации процессов поли-АДФ-рибозилирования и уменьшения содержания НАД⁺ при СД 1 типа происходил рост фрагментации ПАРП-1 и снижения уровня НАД-зависимой деацетилазы СИРТ1, что может характеризовать степень развития нейродегенеративных изменений в мозге. Обнаружено, что патологические нарушения функций мозга с СД происходят на фоне периферической диабетической нейропатии. Доказательством этого является снижение содержания коллагена в ткани большеберцовой и малоберцовой костей, что может быть обусловлено как структурной перестройкой коллагена так и его модификациями, как результат изменений его аминокислотного состава, а также изменений содержания витаминов С, В3 и Е в сыворотке крови животных, витаминов, которые участвуют и влияют на синтез коллагена. Применение ингибиторов ПАРП-1, как было установлено влияют на исследуемые процессы и биохимические показатели, которые изменяются при СД 1 типа путем по крайней мере частичной их коррекции.

Полученные данные свидетельствуют о том, что за СД 1 типа существует связь между процессом поли-АДФ-рибозилирования в головного мозга крыс и другими метаболическими процессами и показателями в организме.

Ключевые слова: поли-АДФ-рибозилирование, ингибиторы ПАРП-1, экспериментальный сахарный диабет 1 типа, диабетическая нейропатия, активные формы кислорода, оксидативный стресс.

SUMMARY

Diakun K.O. Mechanisms of the action of PARP-1 inhibitors under experimental diabetes mellitus. – Manuscript. Thesis for scientific degree of candidate of biological sciences by specialty 03.00.04 – Biochemistry. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, 2020.

Dissertation is devoted to study of mechanisms of action of PARP-1 inhibitors (1,5-isoquinolinediol and nicotinamide) on processes of poly-ADP-ribosylation in brain of rats in experimental type 1 diabetes mellitus (DM). The corrective effect of the used structurally different PARP-1 inhibitors on the processes of poly-ADP-ribosylation of nuclear proteins in the rat brain at the level of their content, PARP-1 activity and enzyme fragmentation, as well as at the level of *Parp-1* gene expression was revealed. It was found that in type 1 diabetes there was an intensification of oxidative stress, the development of inflammatory processes. Nicotinamide administration led to inhibition of oxidative stress and reduced the level of the interleukin-4. Against the intensification of poly-ADP-ribosylation processes and decrease in NAD⁺ content in type 1 diabetes, there was an increase in PARP-1 fragmentation and a decrease in NAD-dependent deacetylase SIRT1, which may characterize the degree of neurodegenerative changes in the brain. It was found that pathological disorders of the brain in diabetes occur simultaneously with peripheral diabetic neuropathy. Proof of this is the decrease in collagen content in the tissue of the tibia and fibula, which may be due to both structural rearrangement of collagen and its modifications, as a result of alterations in its amino acid composition and changes in vitamins C, B3 and E in animal serum, vitamins, which are involved and affect collagen synthesis. The use of PARP-1 inhibitors has been shown to improve, at least partially, the studied processes and biochemical parameters which were impaired by type 1 diabetes.

The data obtained indicate that in type 1 diabetes there is a relationship between the processes of poly-ADP-ribosylation in the rat brain and other metabolic processes and parameters in the body.

Keywords: poly-ADP-ribosylation, PARP-1 inhibitors, experimental type 1 diabetes, diabetic neuropathy, reactive oxygen species, oxidative stress.