

Інститут біохімії імені О. В. Палладіна
Національна Академія Наук України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

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

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

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

_____ *підпис, ініціали та прізвище здобувача*

Науковий керівник: Кучмеровська Тамара Муратівна, д.б.н., професор

КИЇВ – 2020

АНОТАЦІЯ

Дякун К.О. Біохімічні особливості розвитку експериментальної діабетичної нейропатії та шляхи її корекції. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.04-біохімія. – ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2020.

Цукровий діабет (ЦД) є багатofакторним метаболічним захворюванням, що досить часто супроводжується численними ускладненнями та є на даний час одним з найважливіших ендокринних захворювань та потребує науково-обґрунтованого вирішення. Станом на 2019 рік у світі налічувалось близько 463 мільйонів хворих на ЦД порівняно з 425 мільйонами хворих у 2017 році. Загальна кількість випадків захворювання на ЦД за прогнозами може зрости на 48 % за період з 2017 по 2045 рік. Різні ендогенні (переважно генетичні) та екзогенні фактори можуть бути причиною його виникнення. Серед численних ускладнень значна увага приділяється з'ясуванню біохімічних механізмів, які лежать в основі розвитку діабетичної нейропатії (ДН).

На даний час запропоновано відносно широкий спектр фармакологічних препаратів для симптоматичного лікування периферичних ДН та енцефалопатій. Ряд нових препаратів, включаючи ацетил-L-карнітин, альфа-ліпоєву кислоту, інгібітори протеїнкінази С (наприклад, рубоксистаурин), інгібітори альдозоредуктази (фідарестат), засоби, що впливають на накопичення кінцевих продуктів (аміногуанідин), які впливають на гексозаміновий шлях (бенфотіамін), інгібітори ангіотензин-перетворюючого ферменту (трандолаприл), а також інгібітори полі-(АДФ-рибозо)-полімерази (PARP-1), зокрема нікотинамід (НАМ) та 1,5-ізохіноліндіол (ІХД), досліджуються та використовуються при проведенні клінічних випробувань. Більшість цих препаратів можуть діяти одночасно за допомогою декількох механізмів. Зокрема, НАМ характеризується досить широким спектром дії,

впливаючи на нейромедіаторні системи, зокрема на серотонінергічну систему, а також на функціонування натрій-калієвої помпи. Ми спостерігали відповідні ефекти в мозку щурів в умовах розвитку ЦД 1-го типу. Зрозуміло, що вибір найбільш ефективного препарату для лікування конкретного типу ДН (енцефалопатія, вегетативна нейропатія або периферична нейропатія) неможливий без ідентифікації всіх можливих механізмів дії інгібіторів PARP-1. Це стимулювало до пошуку деяких нових ефективних препаратів цілеспрямованої дії. Крім того, з'ясування впливу інгібіторів PARP-1 на розвиток ДН також важливе для глибшого розуміння не тільки механізмів дії цих препаратів, але й конкретних механізмів, що лежать в основі розвитку ДН, які залишаються недостатньо вивченими. Як відомо, хронічна гіперглікемія супроводжується значними фізіологічними, біохімічними та гістологічними змінами у пацієнтів, які страждають на ЦД. Такі зміни неминуче призводять до розвитку ендотеліальних дисфункцій. Це, у свою чергу, спричиняє зниження інтенсивності кровообігу та розвиток внутрішньонейронної та внутрішньоклітинної гіпоксії. Стан генералізованої гіпоксії посилює розвиток патофізіологічних та морфологічних змін у клітинах мозку за умов ДН. У такій ситуації розвиваються кардинальні зміни в ендотелії судин, які забезпечують кровопостачання нервів. У цьому випадку починають відбуватися суттєві зміни важливих молекулярних механізмів; зокрема, виникає стрес ендоплазматичного ретикулума, посилене фосфорилування мітоген активованих протеїнкіназ (МАРК), активація PARP-1 та активація кількох інших ферментів. За цих умов може також розпочатися розвиток запальних процесів, які провокують тканини швидко реагувати на відповідні зміни. Це призводить до супутньої участі різних типів клітин, при яких регуляція експресії певних генів може бути порушена через дію відповідних негативних факторів. Враховуючи все вищезазначене, ми досліджували метаболічні шляхи, що опосередковували дії двох інгібіторів PARP-1, НАМ та ІХД в умовах розвитку дисфункцій мозку, індукованих експериментальним ЦД 1 типу. Метою роботи було дослідити

механізми дії інгібіторів полі(АДФ-рибозо)полімерази–1 1,5-ізохіноліндіолу та нікотинаміду за експериментального цукрового діабету 1 типу.

Дослідження були проведені на експериментальній моделі цукрового діабету (ЦД) 1 типу на щурах лінії Wistar. Для досягнення мети було поставлено ряд завдань: 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-рибозилізованих протеїнів та фрагментацію PARP-1 у головному мозку щурів за експериментального ЦД 1 типу; 4) Визначити вміст колагену типу I у великогомілкових та малоогомілкових кісток та з'ясувати залежність його вмісту від концентрації вітамінів C, E та B₃ у сироватці крові та печінці діабетичних щурів та за введення на його фоні нікотинаміду.

Встановлено, що за розвитку цукрового діабету вірогідно зростала концентрація глюкози крові та зменшувалась маса тіла у щурів. Застосування НАМ та ІХД не призводило до підвищення маси тіла тварин та практично не впливала на рівень глюкози крові.

У ході досліджень виявлено зміни у перерозподілі між двома основними типами лейкоцитів агранулоцитами (моноцити, лімфоцити) та гранулоцитами (нейтрофіли, еозинофіли та базофіли). НАМ сприяв частковому відновленню рівноваги, в той час як ІХД призводив до відновлення цього параметру до рівня контролю. Показано, що рівень АФК у лейкоцитах знижувався більш ефективно при використанні НАМ у порівнянні з ІХД. Встановлено прозапальну дію ІХД про що свідчить зниження рівня моноцитарного хемотаксичного протеїну-1.

Для з'ясування ролі досліджуваних сполук у дисфункціях мозку за ЦД оцінено рівень експресії ключових протеїнів, які приймають участь у багатьох нейродегенеративних захворюваннях. Підтверджено взаємозв'язок між інтенсифікацією процесів полі-АДФ-рибозилування ядерних протеїнів за ЦД 1 типу із іншими НАД-залежними процесами. Продемонстровано, що в екстрактах мозку діабетичних тварин не відбуваються зміни на рівні експресії мРНК PARP-1. На всіх етапах розвитку ЦД 1 типу супроводжувався посиленням розвитку апоптотичних процесів, свідченням чого є збільшення вмісту рибозильованих протеїнів, зокрема протеолітичне розщеплення самого ензиму PARP-1 на фрагменти 27 кДа та 89 кДа. Це може бути маркером ранньої стадії апоптозу у клітинах мозку. Свідченням розвитку апоптотичних процесів є результати, які продемонстрували збільшення активності ензиму PARP-1 в ядрах тканини головного мозку, яку оцінювали за кількістю радіоактивно міченого АДФ-рибозного фрагменту НАД⁺, який включений до клітин головного мозку щурів, а саме загальних ядерних протеїнів. Обидва досліджувані інгібітори PARP-1, як ІХД так і НАМ спричиняли інгібуючу дію на активність PARP-1, що свідчить про їх коригуючий вплив на процеси полі-АДФ-рибозилування ядерних протеїнів за умов їх тривалого введення.

Також виявлено зміни рівня експресії сіртуїну 1 в ядерних екстрактах мозку діабетичних щурів, що проявлялось в зниженні їх вмісту порівняно з контролем, при чому досліджувані інгібітори не мали коригуючої дії.

У ході дослідження показано зниження вмісту НАД⁺ та співвідношення вільних НАД⁺/НАДН пар у мозку діабетичних щурів, що свідчить про порушення регуляторних процесів. На фоні введення ІХД та НАМ підвищувалося співвідношення вільних пар НАД⁺/НАДН в головному мозку щурів, проте їх дія на вміст деацетилази СІРТ1 була незначною.

Використання інгібіторів PARP-1 може бути перспективним терапевтичним підходом, спрямований на корекцію вторинних ускладнень

ЦД 1 типу, у тому числі процесів, асоційованих з полі-АДФ-рибозилуванням.

Нами виявлено активацію регуляторного транскрипційного фактору NFκB у мозку за ЦД 1 типу. Це може також індукувати зміни експресії генів, протеїни яких будуть сприяти запаленню і оксидативному стресу (ОС), апоптозу, що в свою чергу призводитиме до клітинної дисфункції індукованої оксидативним стресом та навіть загибелі клітин. Показано, що за тривалого введення НАМ діабетичним щурам відбувалося незначне зниження рівня експресії NF-κB.

Ми припустили, що нікотинамід може впливати на біосинтез колагену при цукровому діабеті за допомогою піридину динуклеотидів, як шляхом нормалізації амінокислотного метаболізму, так і за рахунок НАДФН-залежної регенерації вітаміну С з подальшим відновленням токоферолів. Існують дані, що вітамін В3 може затримувати експресію генів проколагену типу I і III на рівні транскрипції генів на моделі блеоміцинового фіброзу легень у хомяків.

Це дослідження було проведено для оцінки передбачуваних змін у складі амінокислот кісткової тканини при стрептозотин індукованому ЦД та визначення характеру функціональної взаємодії між наявністю вітамінів та змінами у формуванні колагену типу I в кістках. Ми також перевірили, чи може нікотинамід, як лікарський засіб з широким спектром метаболічних ефектів, впливати на структурні порушення колагену, пов'язані з діабетом, у високій терапевтичній дозі. Показано, що цукровий діабет 1 типу також супроводжується розвитком порушень у поперечному зв'язуванні колагену, про що свідчить зниження вмісту колагену та зміни у перерозподілі амінокислот, які мають безпосередній вплив на структуру спіралі, жорсткість і поперечні зв'язки колагену. Отримані дані продемонстрували зміни у співвідношенні Фішера, які частково нормалізуються введенням НАМ. Було також відмічено зниження вмісту вітамінів С та В₃ у сироватці крові та у печінці, що може бути пов'язаним з їх підвищеним споживанням за рахунок

зростання оксидативного стресу. Крім того спостерігали зростання вмісту α -токоферолу, який являється найбільш поширеним акцептором пероксильних радикалів.

Таким чином, ЦД 1 типу та його ускладнення супроводжуються суттєвими змінами у крові, периферичній та центральній нервовій системі, кістковій тканині. Отримані результати дозволили встановити, що за розвитку діабетичної нейропатії між гіперглікемією, активацією оксидативного стресу, розвитком поперечних зшивок у колагені, апоптозом існує зв'язок.

Ключові слова: цукровий діабет, нейропатія, оксидативний стрес, гіперглікемія, нікотинамід, 1,5-ізохіноліндіол, PARP-1.

SUMMARY

Dyakun K.O. Biochemical features of experimental diabetic neuropathy and ways of correction. – Manuscript.

Dissertation for a candidate of the biological sciences degree in specialiaty (Doctor of Philosophy) 03.00.04-biochemistry. - ESC "Institute of Biology and Medicine", Kyiv National Taras Shevchenko University, Kyiv, 2019.

Diabetes mellitus (DM) is a multifactorial metabolic disease that is often accompanied by numerous complications and is currently one of the most important medical and social problems that needs a scientifically sound solution. As of 2019, there were approximately 463 million patients with diabetes worldwide, compared to 425 million in 2017. The total number of cases of diabetes mellitus is projected to grow by 48% between 2017 and 2045. Various endogenous (mainly genetic) and exogenous factors can cause it. Among the many complications, considerable attention is paid to the elucidation of the biochemical mechanisms underlying the development of diabetic neuropathy (DN).

Currently, a relatively wide range of pharmacological preparations for symptomatic treatment of peripheral DN and encephalopathy is proposed. A number of new drugs, including acetyl-L-carnitine, alpha-lipoic acid, protein kinase C inhibitors (eg, ruboxistaurin), aldose reductase inhibitors (fidarestat),

agents that affect the accumulation of end products (aminoguanidine), which affect the way ginotin), angiotensin-converting enzyme (trandolapril) inhibitors, and poly- (ADP-ribose) -polymerase (PARP-1) inhibitors, including nicotinamide (NAm) and 1,5-isoquinolindiol (ISO), are being investigated and used in clinical trials tests. Most of these drugs can act simultaneously by several mechanisms. In particular, NAm is characterized by a rather broad spectrum of action, affecting neurotransmitter systems, in particular the serotonergic system, as well as the functioning of the sodium-potassium pump. We observed relevant effects in the rat brain under conditions of type 1 diabetes. It is clear that the choice of the most effective drug for the treatment of a particular type of DN (encephalopathy, autonomic neuropathy, or peripheral neuropathy) is not possible without identifying all possible mechanisms of action of PARP-1 inhibitors. This prompted the search for some new effective drugs of purposeful action. In addition, the elucidation of the effects of PARP-1 inhibitors on the development of DN is also important for a deeper understanding not only of the mechanisms of action of these drugs, but also of the specific mechanisms underlying the development of DN, which remain poorly understood. It is known that chronic hyperglycemia is accompanied by significant physiological, biochemical and histological changes in patients with diabetes. Such changes inevitably lead to the development of endothelial dysfunctions. This, in turn, causes a decrease in blood flow and the development of intra-neural and intracellular hypoxia. The condition of generalized hypoxia enhances the development of pathophysiological and morphological changes in brain cells under conditions of DN. In this situation, cardinal changes in the vascular endothelium that provide blood supply to the nerves develop. In this case, significant changes in important molecular mechanisms begin to occur; in particular, endoplasmic reticulum stress, enhanced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), activation of PARP-1, and activation of several other enzymes occur. Under these conditions, the development of inflammatory processes that provoke tissues to respond quickly to changes can also begin. This leads to the concomitant involvement of different

types of cells, in which the regulation of the expression of certain genes can be impaired due to the action of relevant negative factors. Against this background, we investigated metabolic pathways that mediated the actions of two inhibitors of PARP-1, NAm, and ISO in the development of brain dysfunction induced by type 1 experimental diabetes. The aim of this dissertation was to investigate the effectiveness of the use of PARP-1 inhibitors for diabetes and their effect on some metabolic processes.

Studies were performed on an experimental model of type 1 diabetes mellitus on Wistar rats. In order to achieve this goal, a number of tasks were set: 1) To determine whether type 1 PDDs have been investigated to determine whether PARP-1 (ISO and NAm) inhibitors have hypoglycemic, antioxidant and anti-inflammatory effects; 2) To evaluate the level of cytokines as markers of functional activity of different types of immunocompetent cells and the degree of inflammatory processes; 3) Evaluate the level of poly-ADP-ribosylation of proteins in rat brain tissues for diabetes and with the introduction of PARP-1 inhibitors; 4) Find out the relationship between changes in bone collagen structure and bioavailability of type 1 diabetes; 5) Investigate the role of PARP-1 inhibitors on bone turnover in type 1 diabetes.

It was found that with the development of diabetes, blood glucose concentrations were likely to increase and body weight was reduced in rats. The use of NAm and ISO did not increase the body weight of the animals and had virtually no effect on blood glucose. The study identified changes in the redistribution between the two main types of leukocytes agranulocytes and granulocytes. NAm contributed to a partial restoration of equilibrium, while ISO led to the restoration of this parameter to the control level. It has been shown that the level of ROS in leukocytes decreased more effectively when using NAm compared to ISO. Proinflammatory effect of ISO was established as evidenced by a decrease in the level of monocyte chemotactic protein-1.

To find out the role of the compounds under study in brain dysfunction, the level of expression of key proteins, which will play an important role in many

neurodegenerative diseases, was evaluated. It has been found that the intensification of poly-ADP-ribosylation of nuclear proteins by type 1 diabetes is dependent on communication with other NAD-dependent processes.

It has been demonstrated that there is no change in the levels of PARP-1 mRNA expression in diabetic animal brain extracts. The development of type 1 diabetes in its later stages leads to an increase in apoptotic processes, which is evidenced by the results showing an increase in the content of ribosylated proteins proteolytic cleavage of the enzyme PARP-1 into 27 kDa and 89 kDa fragments, which may be evidence of early stage apoptosis (marker) cells. These results correlate with PARP-1 activity in brain nuclei, which was evaluated by the amount of radiolabeled ADP-ribose NAD + fragment included in total rat brain protein of rats. According to the obtained results, ISO and NAM caused inhibition of PARP-1 activity, which indicates the corrective action of PARP-1 inhibitors under their long-term administration.

Changes in the expression level of sirtuin 1 in nuclear extracts of diabetic rat brain were also detected, which was manifested in a decrease in their content compared to controls, whereby the inhibitors tested had no corrective effect.

The study showed a decrease in NAD + content and a ratio of free NAD + / NADH pairs in the diabetic rat brain, indicating that regulatory processes were impaired. The introduction of ISO and NAM increased the ratio of free NAD + / NADH pairs in the brain, but their effect on SIRT1 deacetylase content was negligible.

The use of PARP-1 inhibitors may be a promising therapeutic approach aimed at correcting secondary complications of type 1 diabetes, including processes associated with poly-ADP ribosylation.

We have found activation of the regulatory transcription factor NFκB in the brain by the CD, which can induce changes in the expression of genes whose proteins will enhance inflammation and oxidative stress (OS), causing apoptosis, which in turn can lead to oxidative stress induced by dysfunction of clit. cells. It

has been shown that, with chronic administration of NAm, diabetic rats had a slight decrease in the level of NF- κ B expression.

We hypothesized that nicotinamide may affect collagen biosynthesis in diabetes mellitus by pyridine dinucleotides, firstly by normalizing amino acid metabolism and, secondly, by NADPH-dependent regeneration of vitamin C with subsequent recovery of tocopherols. However, some studies also report that vitamin B3 may delay the expression of procollagen type I and III genes at the level of gene transcription in a model of bleomycin lung fibrosis in hamsters.

This study was conducted to evaluate the predicted changes in bone composition of amino acids in streptozotocin-induced DM and to determine the nature of the functional interaction between the presence of vitamins and changes in type I collagen formation in the bones. We have also tested whether nicotinamide, as a drug with a wide range of metabolic effects, can affect high-dose therapeutic collagen disorders associated with diabetes. Diabetes mellitus has also been shown to be accompanied by the development of disorders in the cross-linking of collagen, as evidenced by a decrease in collagen content and changes in the redistribution of amino acids, which have a direct effect on the structure of the helix, stiffness and cross-links of collagen. The data obtained showed changes in the Fisher ratio, which are partially normalized by the introduction of NAm. Vitamin C and B₃ levels in the serum and in the liver were also noted, which may be associated with increased intake due to increased oxidative stress. In addition, an increase in the content of α -tocopherol, which is the most common acceptor of peroxy radicals, was observed.

Thus, type 1 diabetes and its complications are accompanied by significant changes in blood, peripheral and central nervous system, bone tissue. The results showed that the development of diabetic neuropathy between hyperglycemia, activation of oxidative stress, the development of cross-links in collagen, apoptosis is associated.

Key words: diabetes mellitus, neuropathy, oxidative stress, hyperglycemia, nicotinamide, 1,5-isoquinolindiol, PARP-1.

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

1. Гузик М.М., Дякун К.О., Яніцька Л.В., Кучмеровська Т.М. Вплив інгібіторів полі(ADP-рибозо)полімерази на деякі показники оксидативного стресу в лейкоцитах крові за стрептозотоцинового діабету у щурів. Український біохімічний журнал. 2013; 85(1):62-70.
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.
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.
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.
5. Тихоненко Т., Дякун К., Сергійчук Ю. Мітохондріальна дегідрогеназна активність нервових закінчень мозку щурів. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2016; 73:203-207.
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.
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.
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 Senaptic Membranes from the Braine of Diabetic. *Neurophysiology* – 2019. – 51, No 4, P. 234-247.
 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. (Oral presentations).
 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(ADP-рибозо)полімерази. Матеріали науково-практичної конференції «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології». Дванадцяті Данилевські читання 14-15 березня 2013, Харків, С. 77 – 78 (усна доповідь).
 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

- ХІІ Всеукраїнської наукової конференції студентів, аспірантів та молодих науковців. 14-16 листопада 2012, Київ, С. 37 (усна доповідь.)
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-робозо)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. (усна доповідь)
16. Kuchmerovska Tamara, Sergiichuk Iuliia, Guzyk Mykhailo, Dyakun Kateryna, Tychonenko 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. (Poster)

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. Друк
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 impact of nicotinamide (NA_m) on the key brain functional targets in prevention of diabetic neuropathy. 32nd ECNP Congress Copenhagen, Denmark 7-10 Sept, 2019.
21. Yanitska L.V., Tykhonenko T.M., Guzyk, K. Dyakun, Pryvrotska I.B., 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 (додаток) 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 (додаток) 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.

Зміст

Перелік умовних скорочень.....	19
Вступ.....	20
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури.....	27
1.1. Функціональне значення процесів полі-АДФ-рибозилування протеїнів.....	27
1.2. Процеси полі-АДФ-рибозилування за цукрового діабету.....	33
1.3. Інгібітори PARP-1 та їх застосування у терапії цукрового діабету.....	36
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи.....	44
2.1. Реагенти та матеріали.....	44
2.2. Обладнання.....	44
2.3. Моделювання експериментального ЦД 1 типу та схема введення нікотинаміду (НАМ) та 1,5- ізохіноліндіол (ІХД).....	45
2.4. Одержання сироватки крові щурів.....	46
2.5. Одержання лейкоцитів з периферичної крові щурів.....	46
2.6. Оцінка перерозподілу між різними популяціями лейкоцитів крові щурів.....	46
2.7. Оцінка рівня оксидативного стресу та життєздатності лейкоцитів крові щурів.....	47
2.8. Визначення активності супероксиддисмутази в сироватці крові щурів.....	48
2.9. Визначення вмісту цитокінів в сироватці крові щурів	49
2.10. Визначення концентрації сечової кислоти та креатиніну в сироватці крові щурів.....	49
2.11. Визначення вмісту вітаміну С в сироватці крові та печінці щурів.....	50
2.12. Визначення вмісту вітаміну Е у печінці щурів [213].....	51
2.13. Приготування лізату тканин.....	52
2.14. Фракціонування та отримання ядерних протеїнів головного мозку щурів.....	52

2.15. Визначення концентрації протеїнів за поглинанням в УФ-області.....	53
2.16. Визначення концентрації протеїнів за методом Бредфорд [121].....	53
2.17. Визначення активності PARP-1 у ядрах головного мозку щурів.....	53
2.18. Електрофорез протеїнів у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію [125].....	54
2.19. Імуноблот-аналіз протеїнів [126].....	54
2.20. Визначення експресії мРНК PARP-1 у головному мозку щурів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.....	56
2.21. Визначення вмісту цитохрому P450 2E1 (CYP 2E1) у печінці щурів....	57
2.22. Визначення вмісту НАД ⁺ та співвідношення вільних НАД ⁺ /НАДН в головному мозку щурів.....	57
2.23. Виділення колагену типу 1 з великогомілкових та малоогомілкових кісток щурів, визначення його амінокислотного складу.....	61
2.24. Статистична обробка результатів.....	62
РОЗДІЛ 3. Показники розвитку патогенетичних процесів за ЦД 1 типу за введення НАМ або ІХД.....	63
3.1. Концентрація глюкози в крові та маса тіла тварин за ЦД 1 типу.....	63
3.2. Розвиток оксидативного стресу (ОС) в лейкоцитах.....	64
3.3. Рівень про-/антизапальних цитокінів за умов ЦД 1 типу.....	73
РОЗДІЛ 4. Перебіг процесів полі-АДФ-рибозилування у тканинах головного мозку діабетичних щурів за введення ІХД або НАМ.....	79
РОЗДІЛ 5. Ефект інгібіторів PARP-1 на обмінні процеси в великогомілкових та малоогомілкових кістках щурів за ЦД 1 типу.....	89
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	104
ВИСНОВКИ.....	110
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	112
ДОДАТОК.....	140

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ СКОРОЧЕНЬ

АТФ	аденозинтрифосфат
GAPDH	гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа
IC ₅₀	концентрація інгібітора, при якій активність ензиму становить 50 % від початкової
ІХД	1,5-ізохіноліндіол
МАРК	мітоген-активуючі протеїнкінази
Mn-SOD	Mn-залежна супероксиддисмутаза
НАД ⁺	нікотинамідаденін-динуклеотид
НАДН	відновлений нікотинамідаденін-динуклеотид
НАДФ ⁺	нікотинамідаденін-динуклеотидфосфат
НАДФН	відновлений нікотинамідаденін-динуклеотидфосфат
НАМ	нікотинамід
NO	оксид азоту (II)
NOS	NO-синтаза
eNOS	ендотеліальна NO-синтаза
iNOS	індуцибельна NO-синтаза
nNOS	нейрональна NO-синтаза
PARP-1	полі(ADP-рибозо)полімераза - 1
PKB	протеїнкіназа B
PKC	протеїнкіназа C
SGK-1	регульована сироваткою і глюкокортикоїдами кіназа-1
АФК	активні форми кисню
OC	оксидативний стрес
СТЗ	стрептозоточин
ЦД	цукровий діабет
ДН	Діабетична нейропатія
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота

Вступ

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 [1], у тому числі біля 1,5 мільйона в Україні, при цьому у 60 - 70 % хворих розвивається діабетична нейропатія [2, 3].

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 [4-6].

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 (PARP-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 та нитрозативний 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 [7-9]. Використання мишей з іннактивованим геном *Parp-1* та дослідження інгібіторів PARP-1 продемонстрували нові дані щодо регулювання функцій клітин, а також були з'ясовані докази нетривіальних ефектів PARP-1, що напряду не можуть бути пов'язані з процесами репарації ДНК [10]. Тому дослідження інгібіторів PARP-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 PARP-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 PARP-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, Д3, 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 задачі 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 було поставлено ряд завдань:

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 PARP-1 у головному мозку щурів за експериментального ЦД 1 типу.

5. Визначити вміст колагену типу I у великогомілкових та малогомілкових 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 малогомілкових кісток за експериментального ЦД 1 типу та за умов введення інгібіторів PARP-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, СІРТ1, СҮР 2Е1), електрофоретичне визначення рівня фрагментації молекули PARP-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 PARP-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 малоогомілкових кістках щурів підвищувався за експериментального ЦД 1 типу. Використані інгібітори PARP-1 проявляють коригувальний ефект на процеси полі-АДФ-рибозилування 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-рибозилування у запобіганні розвитку та виникнення ускладнень ЦД, а також його ефективного лікування та поглиблюють сучасні уявлення щодо процесів полі-АДФ-рибозилування 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 полі-АДФ-рибозилуванням у мозку щурів проведено спільно із к.б.н. Гузиком М.М. (відділ хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України).

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» (Харків, 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. Дисертаційна робота, обсягом 145 сторінок, складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів дослідження та їх обговорення, висновків, а також списку використаних джерел – 244 найменувань. Робота ілюстрована 31 рисунками та 2 таблицями.

Розділ 1. Огляд літератури

1.1. Функціональне значення процесів полі-АДФ-рибозилування протеїнів

Останнім часом все більшу увагу привертає полі-АДФ-рибоза (PAR), у зв'язку із тим, що вона залучається у широкий спектр клітинних процесів, зокрема таких, як модифікація хроматину, метаболізм нуклеїнових кислот, регуляція транскрипції, загибель клітин та ін. [59] Полі-АДФ-рибозилування – це процеси посттрансляційної модифікації протеїнів, що здійснюється за участю полі(АДФ-рибозо)полімераз (PARP), родина яких нараховує 18 протеїнів, які кодуються різними генами. Головною функцією PARP-1 є забезпечення репарації одноланцюгових розривів ДНК, ексцизійної репарації уражених пуринових та піримідинових основ, а саме після виявлення пошкодженої ділянки молекули ДНК, видалення одного нуклеотиду та заміна на ново-синтезований нуклеотид, який добудовується комплементарно іншому в неушкодженому ланцюгу ДНК [60–62]. PARP-1 приймає участь у синтезі майже 90 % полімерів АДФ-рибози в клітинах ссавців [63, 64]. Вважається, що у клітинах PARP-1 експресується конститутивно, але за наявності розривів ДНК – її ензиматична активність може зростати у 500 разів [65].

Залишки АДФ-рибози, які утворюються в процесі полі-АДФ-рибозилування при ензиматичному розщепленні глікозидного зв'язку між NAM та рибозою в молекулі НАД⁺, зв'язуються із протеїнами-акцепторами, утворюючи лінійні або розгалужені аніонні полімери [60]. До γ -карбоксільної групи залишків глутамінової кислоти протеїнів-мішеней приєднується перший мономер АДФ-рибози через утворення ефірного зв'язку, а наступні зв'язуються за рахунок глікозидних (1-2')-зв'язків [67]. Таким шляхом до протеїну приєднується полімер ковалентним зв'язком, який може містити від 2 до 200 одиниць АДФ-рибозних та може мати місця розгалуження через кожних 20-50 залишків АДФ-рибози (рис. 1.2) [68]. При

приєднанні одного залишку АДФ-рибози до полімеру вивільняється молекула НАМ. Останній може включатися в реакцію ресинтезу NAD^+ , що відбувається в ядрі та/або метаболізувати з утворенням його похідних [69]. Також було показано, що вільні залишки АДФ-рибози, що утворюються в НАД-глікогідролазній (НАД-азній) реакції (можливо і за участю PARP-1), можуть взаємодіяти із залишками лізину у протеїнах з утворенням продуктів шифових основ та з наступною їх перебудовою в кетоамінні похідні [70]. Протеїн-зв'язані кетоамінні похідні можуть за дії PARP-1 утворювати АДФ-рибозні полімери, які приєднуються до протеїнів через залишки лізину [71]. На сьогодні в ядрах клітин ідентифіковані численні мішені, які піддаються ензиматичному полі-АДФ-рибозилуванню, такі як лінкерні гістони H1, корові гістони [67, 72], негістонові структурні компоненти хроматину [73], залучені в метаболізм ДНК, транскрипційні фактори та ензими [74].

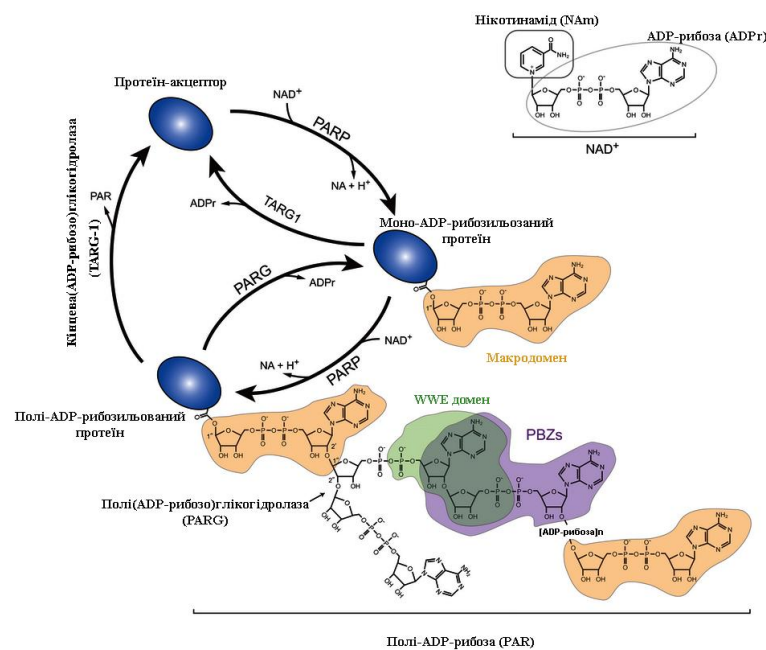


Рис. 1.1. Синтез розгалужених та лінійних ланцюжків PAR за дії полі-АДФ-рибозопротеїнази 1 під час репарації пошкодженої ДНК. NAD^+ залучений до ковалентної модифікації акцепторного протеїну через залишок глутамату (Glu). Показано дію АДФ-рибозил-протеїнази та полі(АДФ-рибозо)глікогідролази на сайти розщеплення полімерного ланцюга [75].

Тим не менш у реакціях PARP-1-залежного полі-АДФ-рибозилування одним із головних акцепторів *in vivo* є сама PARP-1 [60, 76]. Окрім цього, завдяки утвореному негативному заряду в полімері також може змінюватися біохімічні та фізико-хімічні властивості в новоутворених протеїнах, наприклад піддається модифікаціям здатність до протеїн-протеїнових взаємодій та афінність до ДНК, через які відбуваються регуляторні функції [77].

Полі-АДФ-рибозилування має короткий час напівжиття полімеру у середньому даний процес займає менше 2 хвилин *in vivo*, деградація вказаного полімеру може посилюватися за рахунок підвищення концентрації понад 15 мкмоль/л PAR у ядрі клітини [78]. Функціонування двох ензимів, таких як полі(АДФ-рибозо)глікогідролази (PARG, EC 3.2.1.143) та АДФ-рибозил-протеїніази забезпечують зворотність реакцій полі- АДФ-рибозилування. Полі(АДФ-рибозо)глікогідролаза володіє ендоглікозидазною активністю разом з екзоглікозидазною, вона розщеплює рибозо-рибозні зв'язки розгалужених та лінійних ланцюгів PAR [79, 80]. АДФ-рибозил-протеїніаза відщеплює ближчий мономер АДФ-рибози з протеїну акцептора та звільнює 5'- АДФ-3'-деоксипент-2'-енофуранозу [81]. У ссавців виявлено декілька ізоформ полі(АДФ-рибозо)глікогідролаз, які є варіантом сплайсингу одного, і того ж самого гену. Ці ізоформи розміщені в різних клітинних компартментах, в залежності від знаходження самої PARP. Найбільш поширеними ізоензимами є активний ядерний протеїн PARG (110 кДа) та коротка мітохондріальна ізоформа (65 кДа), однак існує декілька проміжних форм з молекулярною масою близько 100 кДа, функціональна роль яких мало досліджена [82]. За дії цих ензимів, продуктами протікання реакції є вільні АДФ-рибозні та полі- АДФ-рибоза мономери. В результаті проходження полі(АДФ-рибозо)глікогідролазної реакції утворюються не зв'язані полімери АДФ-рибози, які здатні зв'язуватися нековалентними зв'язками зі специфічними мотивами певних протеїнів які є чутливими до АДФ-рибози, що може впливати на їхні властивості. Тобто, PAR зв'язуючись

нековалентними зв'язками з протеїнами має здатність змінювати їх структуру та функціональну активність, а незв'язаному стані запускає звільнення з мітохондрій фактору, що індукує апоптоз (AIF) [83].

Відомо, що мотивами протеїнів які зв'язуються з полі(АДФ-рибозою є послідовності амінокислот близько з 20 залишків амінокислот [84]. За наявності в протеїнах цієї послідовності можна стверджувати про їхню здатність взаємодіяти з полі- АДФ-рибозою. На сьогоднішній день існують дані що до протеїнів які є акцепторами PAR відносять ДНК-азу, залежну від каспази, ДНК-лігазу III, ДНК-полімераза ϵ , XRCC (X-ray repair cross-complementing group 1), індукцйбельну та нейрональну NO-синтазу (nNOS), NF- κ B, ДНК-залежні протеїнкінази (DNA-PKcs), інгібітор циклінзалежної кінази-1 (p21CIP1/WAF1), проапоптичний протеїн p53. Таким чином, фізіологічне значення PARP-1 у реалізації клітинних функцій за рахунок вільних полімерів АДФ-рибози є надзвичайно важливим.

Тривалий час вважали, що полі(АДФ-рибозо)глікогідролаза є чи не одним з клітинним ензимів, який здатний каталізувати гідроліз полімерів АДФ-рибози до незв'язаної АДФ-рибози [85]. Цей продукт реакції є потенційним глікуючим фактором, який може сприяти неензиматичній модифікації та пошкодження протеїнів [70]. АДФ-рибозопірофосфатаза здійснює розщеплення вільних молекул АДФ-рибози з утворенням АМР та рибозо-5-фосфату, який значно меншою мірою індукує процес неензиматичного глікозилування [86]. Останнім часом було показано, що катаболізм PAR є більш складним процесом, оскільки ідентифіковано ще один альтернативний шлях деградації полімеру. Він здійснюється за участю АДФ-рибозиларгінінгідролазою-3, протеїном який володіє PAR-гідролізуючою активністю з молекулярною масою 39 кДа, який є структурно відмінний від PARG [87].

Ензим PARP-1 (Е.С. 2.4.2.30) — це одиз з перших відкритих та найбільш досліджений представників полі- АДФ-рибозилуючих ензимів. У відповідь на пошкодження молекул ДНК, PARP-1 запускає синтез полімерів

АДФ-рибози, акцепторами яких є різні протеїни клітинних ядер, зазвичай асоційованих з хроматином (гетеромодифікація) або ж сам PARP-1, що здатен до аутомодифікації [60, 71]. Цей ензим може взаємодіяти з різними структурами ДНК: суперспіралізованою, одно- і двонитковими розривами, «ДНК-шпильками» та «хрестоподібними структурами».

Структура молекули ензиму складається із шести доменів, з яких добре вивчено чотири (рис. 1.3) [61, 62]. N-кінцевий ДНК-зв'язувальний домен А (DBD) містить два «цинкових пальці» (FI, FII), які виконують функцію молекулярних сенсорів розривів ДНК та взаємодіють із протеїнами-акцепторами PAR. Характерна Zn^{2+} - зв'язувальна послідовність $C-X_2-C-X_{28,30}-H-X_2-C$ «Цинкових пальців» в яких X — будь-який амінокислотний залишок. Однак, їх відмінність від інших протеїнів з «цинковими пальцями» (транскрипційні фактори і деякі ензими, які здатні взаємодіяти з ДНК), в молекулі PARP-1 полягає у набагато більшій кількості амінокислотних залишків. Подібну до PARP-1 структуру «цинкових пальців» має лише ДНК-лігаза III та 3'-ДНК-фосфоестераза з *Arabidopsis thaliana* [65, 88].

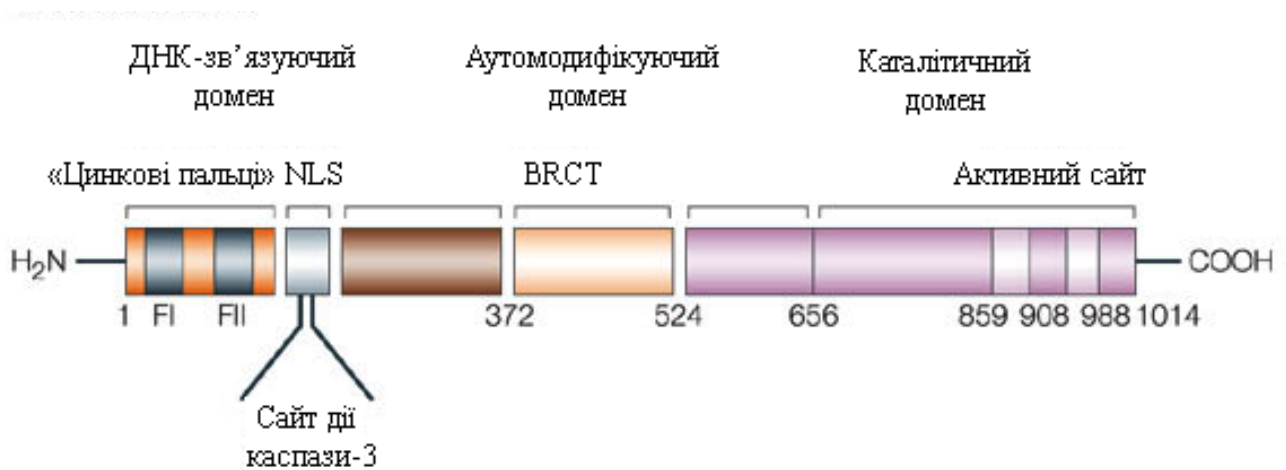


Рис. 1.2. Структурна організація ензиму PARP-1: доменна будова. Використано згідно [89], із модифікаціями

У структурі домену В є дві ділянки типу спіраль-поворот-спіраль (helix-turn-helix) та сигнал ядерної локалізації (NLS). Останній є залученим

в механізм розпізнавання ензиму та його наступного транспортування за участю протеїнів ядерної пори з цитоплазми в ядро. Зазначають, що у структурі цієї послідовності міститься також сайт для дії каспази-3 [90]. Автомодифікуючий домен D, який містить п'ять залишків глютамінової кислоти (сайти авто-рибозилування) та який регулює взаємодію між ДНК та PARP [91]. Окрім того, мотив BRCT (C-terminal domain of a breast cancer susceptibility protein) здатен регулювати протеїн-протеїнові взаємодії в ядрах клітини [92]. С-кінцевий домен F, який має високо консервативну амінокислотну послідовність, забезпечує каталітичну активність PARP-1. При порівнянні кристалічних структур активного центру дифтерійного токсину з каталітичним доменом PARP-1 було встановлено ідентичну структуру НАД-зв'язувальної ділянки, що включає: β – складчатий шар— α – спіраль—петля — β – складчатий шар — α – спіраль. Дана Структура є унікальною і виступає в якості маркера молекул, які належать до родини PARP (їхнім своєрідним «автографом») [61, 93]. Окрім того, у структурі каталітичного домену PARP-1 є додаткова та надчутлива ділянка α -спіралі, яка забезпечує передачу сигналу на інші молекули при взаємодії її із пошкодженою ДНК. Однак на даний час є не достатньо інформації щодо функцій доменів С та Е [64, 94]. Варто зазначити, що завдяки саме такій складній організації доменів PARP-1 може взаємодіяти із ДНК та хроматином, полі-АДФ-рибозилувати відповідні протеїнові молекулярні мішені в клітинних ядрах, що в свою чергу забезпечує підтримання тонкого регулювання експресії генів та структурно-функціональної цілісності геному.

1.2. Процеси полі-АДФ-рибозилування за цукрового діабету

За розвитку патологічних процесів відбуваються зміни у перебігу процесів полі-АДФ-рибозилування. При цьому не виключенням є і ЦД, який розвивається внаслідок руйнування острівцевих β -клітин підшлункової залози за дії різними ендо- чи екзогенних чинників. Згідно сучасних уявлень характерним для ЦД 1 типу є загибель інсулінпродукуючих клітин, спричинена запальною автоімунною реакцією. У багатьох експериментальних дослідженнях було показано, що введення тваринам таких сполук, як стрептозотонин (СТЗ) або алоксан також призводить до масової загибелі β -клітин підшлункової залози, індукуючи розвиток ЦД 1 типу [95]. Більше того, завдяки тому, що СТЗ та нітрососечовина мають структурну подібність до глюкози будуть відбуватися суттєві зміни у вуглеводневому обміні, специфічно руйнуючи бета-клітини.

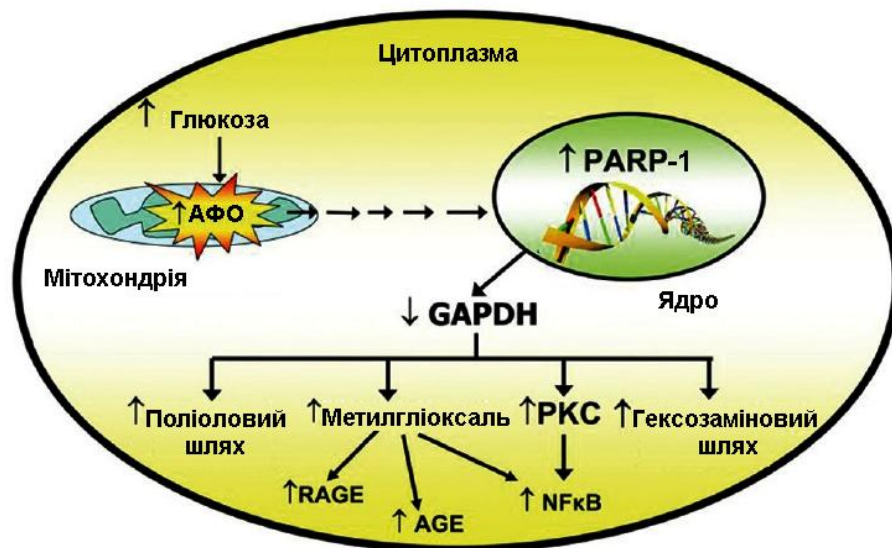


Рис. 1.3. Схема реалізації механізмів ушкодження клітин при мікрovasкулярних ускладненнях за ЦД. Використано згідно [57], із модифікаціями

За ЦД та його ускладень особливо кардіоміопатії, нефропатії, ретинопатії та нейропатії, серед механізмів, які призводять до їх виникнення, значна роль належить надактивації процесів полі-АДФ-рибозилування ядерних протеїнів ключовим ензимом яких є PARP-1. Існують літературні дані, що за ЦД та його ускладнень істотно зростає вміст полі-АДФ-рибозильованих протеїнів у сідничному нерві, дорсальних спинно-мозкових гангліях, спинному мозку, нирках і сітківці ока тварин за діабету 1-го та 2-го типу [102]. Тому шляхи пригнічення процесів полі-АДФ-рибозилування потребують пошуку нових інгібіторів їх ключових ензимів.

Не дивлячись на те, що до механізмів розвитку ЦД, а також його ускладнень діабетичної нейропатії зокрема залучено активація поліолового шляху обміну глюкози [7], полі-(АДФ рибозо)-полімерази (PARP) [8], шлях гексозаміну [9], шлях сигналізації протеїнкінази С (PKC) [10], зростання вмісту кінцевих продуктів глікування (AGEs) [11], підвищення рівня прозапальних цитокінів а саме інтерлейкіну-1 β (IL-1 β), інтерлейкіну (IL-6) і фактору некрозу пухлини α (TNF- α) [12], порушення регуляції факторів росту [13], аутофагічний шлях [15], шлях wnt [16], шлях циклооксигенази (COX) [17], та шлях ліпоксигенази (LOX) [18], однак на даний час не з'ясовано остаточно всі механізми які лежать в основі розвитку та перебігу ЦД та його ускладнень, особливо ДН, а також продовжується пошук шляхів для їх корекції. Вважають, що оксидативний стрес є одним із основних чинників, які призводять до змін у функціонуванні метаболічних шляхів за діабетичної нейропатії.

Оскільки існують численні дані літератури, щодо біохімічних, метаболічних та функціональних порушень при діабеті, що призводять розвиток оксидативного стресу (ОС), який, як вважають, відіграє ключову роль при розвитку всіх ускладнень діабету [27, 29]. Важливо також з'ясувати внесок запальних процесів у розвитку ЦД. ОС за якого відбувається над активація АФК в свою чергу може призводити до розвитку запальних процесів у органах, тканинах та клітинах. Саме ці короткоживучі вільні

радикали АФК, що утворюються у мітохондріях і призводять до пошкоджень та дисфункцій клітин та руйнування багатьох їх структурних компонентів, що в свою чергу призводить до порушення функцій протеїнів, ліпідів, мембран, ДНК. Тобто ОС може призводити навіть до загибелі клітин шляхом некрозу або апаптозу. За таких умов вміст клітин може вивільнюватися в міжклітинний простір, що в свою чергу призводитиме до функціональних змін в оточуючих клітинах, тканинах і викликати каскад різних патологічних порушень зокрема розвитку запальних процесів. Разом з тим, як розвиток ОС так і запальних процесів в значній мірі залежить від особливостей перебігу метаболічних процесів в різних органах тканинах та клітинах, а також від їх залежності від внутрішньоклітинного окисно-відновного стану (редокс потенціал) зокрема співвідношення вільних НАДФ/НАДФН пар, а також співвідношення концентрацій відновленого глутатіону до окисленого.

ЦД характерним для якого є гіперглікемія, супроводжується також посиленою генерацією вільних радикалів внаслідок автоокислення глюкози не тільки за рахунок утворення супероксид аніон-радикалів, а також гідроген пероксиду [53], що може призводити до диструктивного окислення молекул протеїнів та ліпідів. В свою чергу гіперглікемія, яка призводить до інтенсифікації утворення АФК у бета-клітинах підшлункової залози, де ці реакційно активні молекули будуть також зазнавати змін, що може викликати їх апоптичну загибель.

Слід зазначити, що за обох типів діабету ОС розвивається також в ендоплазматичному ретикулумі [50], який може призводити як до втрати бета-клітин так і до розвитку інсулін резистентності. За гіперглікемії, яка супроводжується запальними процесами, відбувається модифікація функціонально-важливих протеїнів, а також відбуваються активація чутливого до окисно-відновного стану клітини ядерного фактору NF- κ B [54] та зміни активності багатьох ензимів, зокрема гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази.

1.3. Інгібітори PARP-1 та їх застосування у терапії укрового діабету

На основі вищерозглянутого стає очевидним, що зміни у перебігу процесів полі-АДФ-рибозилування, особливо за їх надактивації, як результат підвищення активності їх ключового ензиму PARP-1 призводить до виникнення діабетичних ускладнень. Це обґрунтовує доцільність використання інгібіторів PARP як у випадку монотерапії, так і, не виключено, разом із іншими глюкозонормалізуючими антидіабетичними препаратами. Тому пошук перспективних інгібіторів PARP-1 є надзвичайно актуальною медико-соціальною проблемою.

На даний час існує численна група фармацевтичних препаратів, які були розроблені, перш за все, для лікування ракових захворювань, інсульту, інфаркту міокарда, а також нейродегенеративних захворювань. Було встановлено, що інгібітори PARP-1 також здатні пригнічувати продукування iNOS в макрофагах, селектину Р-типу та міжклітинних адгезивних молекул-1 (ICAM-1) в ендотелійних клітинах. Інгібітори PARP-1 також можуть проявляти протизапальну дію. Їхнє використання пригнічує розвиток некрозу шляхом запобігання транслокації та інфільтрації нейтрофілів в ушкоджені тканини. Більше того, надмірна активація PARP-1 може досить швидко призвести до пошкодження або загибелі клітин в результаті виснаження запасів енергії. Оскільки кожна молекула відновленого НАД⁺ використовує чотири молекули АТФ, при надмірній активації PARP-1, пул НАД⁺ виснажується, що в свою чергу призводить до зниження вмісту АТФ. Існують дані, згідно яких за активації PARP-1 розвивається нейротоксичність, індукована як N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідіном, так і NO, що показано на первинній культурі кортикальних нейронів і на гіпокампальних зрізах та якій можна запобігати в залежності від ступеню інгібування PARP-1 [105].

Незважаючи на те, що пошук інгібіторів PARP-1 проводився досить інтенсивно і розпочатий ще в 80-х роках ХХ сторіччя, він продовжується і нині. Чимало досліджень були спрямовані на синтез та аналіз похідних

бензамідів. Однак, в ряді робіт було показано, що інгібіторною активністю володіють також сполуки, які відрізняються за структурою від бензамідів та НАМ: піримідинові основи та нуклеозиди, метильовані ксантини, бензопірони, ізохіноліни, жирні кислоти та ін. [106]. Значна робота по дослідженню структури інгібіторів PARP-1 була проведена групою Kunihiro Ueda, в результаті чого були протестовані 132 природні та синтетичні сполуки [106]. У результаті були виявлені ті, що здатні інгібувати PARP-1 в концентраціях від 0,1 - 1,0 мкмоль/л, тобто майже в 100 разів менших, ніж бензаміди. Ці інгібітори відносять до поліароматичних гетероциклічних сполук, похідних 1,8-нафталіміду, 6-фенантрідінону та ізохіноліну.

До першого покоління інгібіторів PARP відносять нікотинамід (НАМ) та деякі близькі до нього за структурою аналоги. Схожими за структурою до нікотинаміду є бензамід та його похідні 3-амінобензамід та 3-метоксибензамід (рис. 1.4) [236].

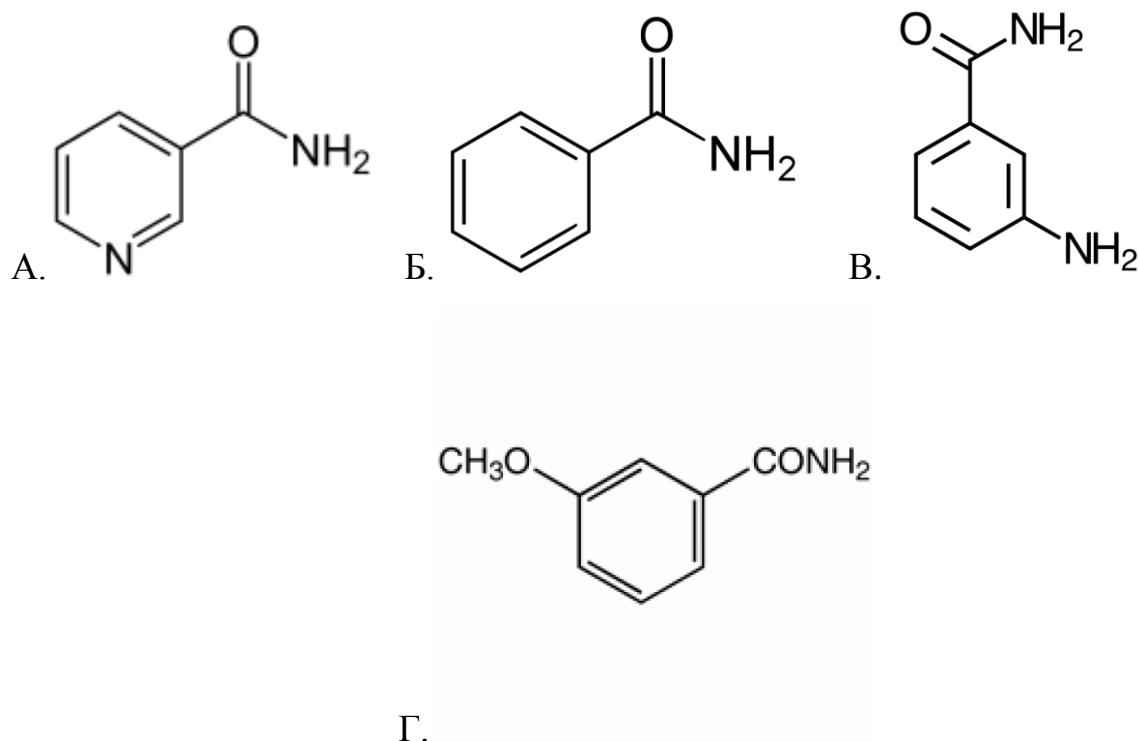


Рис. 1.4. Структурна формула: А. Нікотинамід, Б. Бензамід, В. 3-амінобензамід, Г. 3-метоксибензамід.

Дослідження похідних бензамідів показали важливість карбоксильної групи для інгібуючої активності [237, 238], а також припускають, що бензаміди інгібують PARP шляхом зв'язування з активним центром ферменту конкуруючи з НАД⁺ [237, 238, 239]. Крім того дані сполуки можуть зв'язуватися з ДНК, тим самим попереджаючи зчитування розривів ДНК ензимом PARP [237, 238].

НАм та ніотинова кислота є біологічно активними формами вітаміну В₃. НАм входить до складу молекул НАД⁺ та НАДФ⁺, які приймають участь в окисно-відновних процесах у тканинах організму. Більше того, сам по собі НАМ володіє антиоксидантною та цитопротекторною здатністю. В організмі НАМ є попередником біосинтезу НАД⁺, субстрату для процесів полі-АДФ-рибозилування та інгібітором PARP-1 [113].

Спектр дії нікотинаміду є надзвичайно широким, зокрема він залучений у цілу низку таких біологічних процесів, як біосинтез НАД⁺, функціонування імунної системи, нейтралізація вільних радикалів в клітині, інгібування транскрипції та трансляції та ін. [114].

Не виключено, що індукована ЦД надактивація процесів полі-АДФ-рибозилування у різних органах може мати свої особливості, обумовлені специфікою перебігу у них метаболічних процесів, що на даний час недостатньо з'ясовано. Крім того, за таких умов можуть відбуватися зміни в інших НАД-залежних процесах та регуляторних системах, в результаті порушення рівноваги концентрацій вільних НАД⁺/НАДН пар.

В 1990-х роках були синтезовані нові інгібітори PARP другого покоління на основі нікотинаміду, причому в їх структурі цис-група орієнтована в цис-конформації, що є необхідним для коректної взаємодії з НАД⁺ зв'язуючи сайтом PARP-1 [237]. Отримання даних сполук стало можливим завдяки структурно-функціональним дослідженням, які визначали основні принципи, необхідні для інгібування PARP (рис. 1.5):

- 1) Багата на електрони ароматична чи поліароматична гетероциклічна система;

- 2) Зв'язок який не розщеплюється по положенню, яке відповідає 3-положенню у бензамідів;
- 3) Карбонільна група, яка має по меншій мірі один протон, необхідний для утворення водневого зв'язку з ферментом. Заміна водню на залишок метилу призводила до втрати PARP-інгібуючої активності [240]

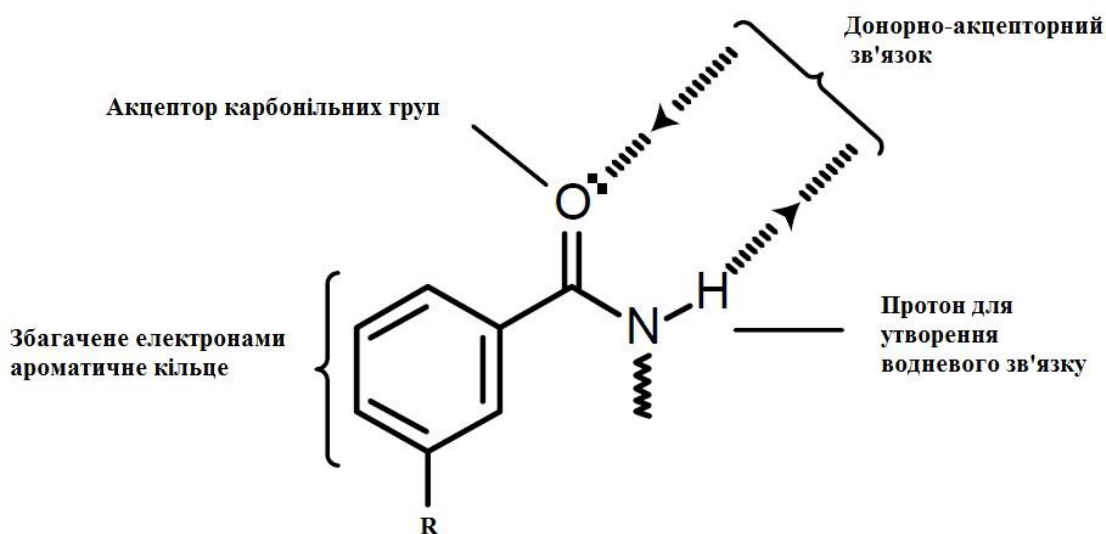


Рис. 1.5. Особливості структури потенційних інгібіторів PARP другого покоління [240, зі змінами].

Було синтезовано ряд сполук на основі бензамідів з більш вираженою інгібуючою здатністю – дигідроізохінолінів та ізохінолінів, найпоширеніші з них: 5-аміноізохінолінон, 1,5-дигідроізохіолін, 2-метил-4(3H)-хіназолінон, 4-аміно-1,8-нафталімід, 2-нітро-6-(5H)-фенантріденон, 1,5-ізохіноліндіол та інші (рис. 1.6) [237, 241]. Ковалентне з'єднання карбонільної групи в складі гетероциклічного кільця проявляє більшу інгібуючу здатність до PARP порівнянно з інгібіторами першого покоління [240].

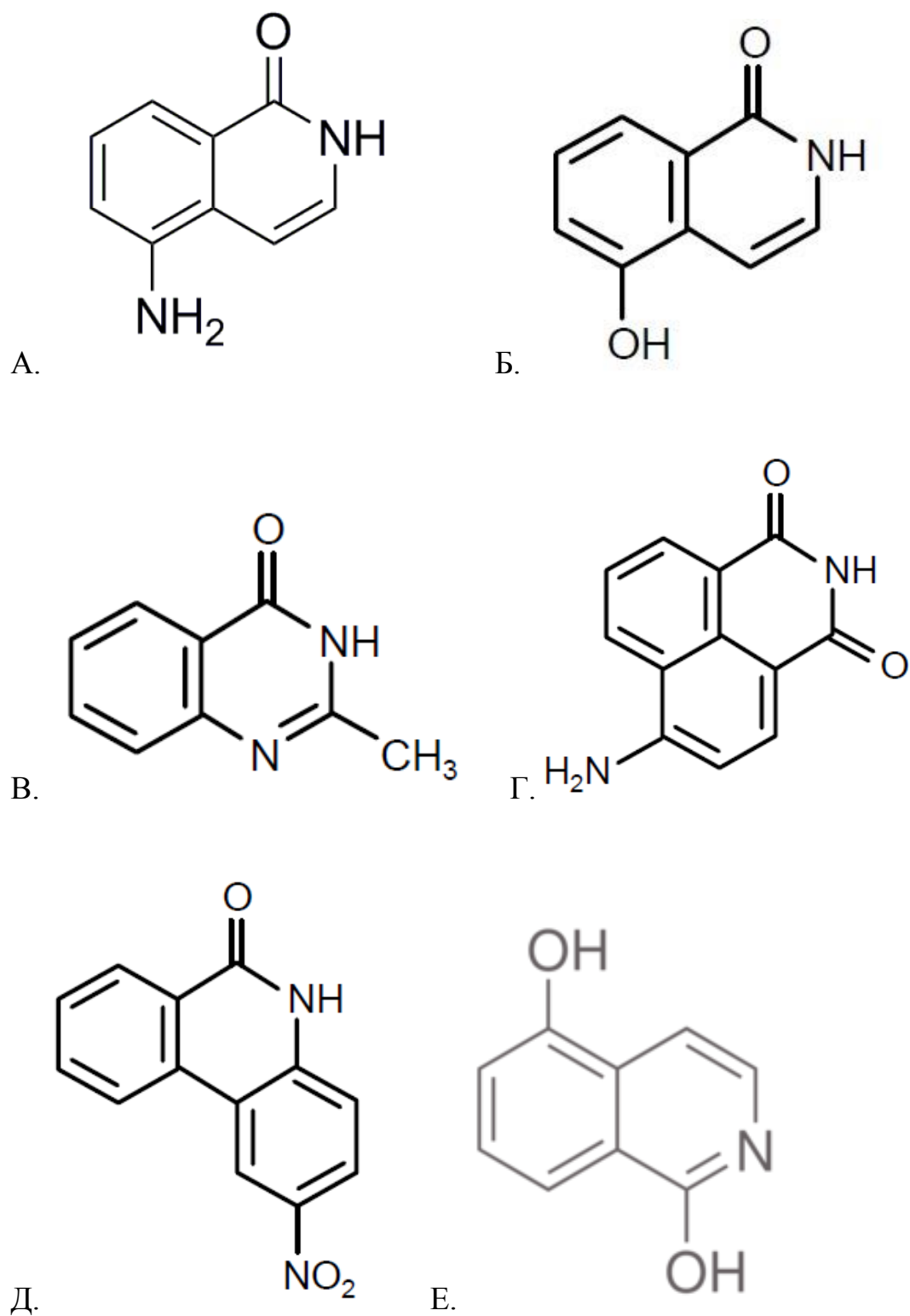


Рис. 1.6. Структура найпоширеніших інгібіторів PARP другого покоління: А. 5-аміноізохінолінон, Б. 1,5-дигідроізохіолін, В. 2-метил-4(3Н)-хіназолінон, Г. 4-аміно-1,8-нафталімід, Д. 2-нітро-6-(5Н)-фенантріденон, Е. 1,5-ізохіноліндіол

Як видно із рис. 1.6 у структурі ІХД є дві функціонально активні гідроксильні групи, які можуть зв'язуватись з молекулою PARP-1 та впливати на його активність. На даний час існують дані, що ІХД є потужним інгібітором PARP-1 ($IC_{50} = 0,39$ мкмоль/л), який пригнічує індуковану ЦД активацію АФК, PARP, каспази-3 та фосфорилування сигнального каскаду ERK1/2 [107].

Показано також, що ІХД є інгібітором iNOS *in vitro* у макрофагах мишей при стимуляції ліпополісахаридом [108]. Така його здатність є дуже важливою, оскільки індукція синтази оксиду азоту призводить до посилення запальних процесів та канцерогенезу [109, 110]. Останнім часом з'явилися генетичні і фармакологічні дослідження, які свідчать про можливий взаємозв'язок між шляхами PARP та iNOS [111, 112].

Встановлення кристалічної структури каталітичного домену PARP-1 курки дозволило отримати нові, ще більш дієві інгібітори третього покоління [237, 240]. Згідно кристалізації PARP-1 з деякими інгібіторами в НАД⁺-зв'язуючому сайті, показано що карбоксамідна група інгібіторів утворює декілька водневих зв'язків з білком, саме тому закріплення карбоксамідної групи в гетероциклічному кільці попереджає її вільне обернення, як це відбувається у випадку з 3-амідобензамідом і значно знижує вільну енергію утворення комплексу інгібітора з PARP-1. В цих дослідженнях було показано, що ефективність інгібування залежить від орієнтації кисню в карбоксильній групі в положенні при якому він утворює два водневих зв'язків з серином 904 та гліцином 863, в той час як сусідній азот амідної групи утворює водневий зв'язок з гліцином 863 [237, 240].

На основі кристалографічних даних створено декілька нових типів інгібіторів PARP, які містять карбоксамідну групу, яка вбудована в кільце (рис. 1.7): похідні трициклічних лактам-індолів і трициклічних лактам-бензimidазолів [242, 240].

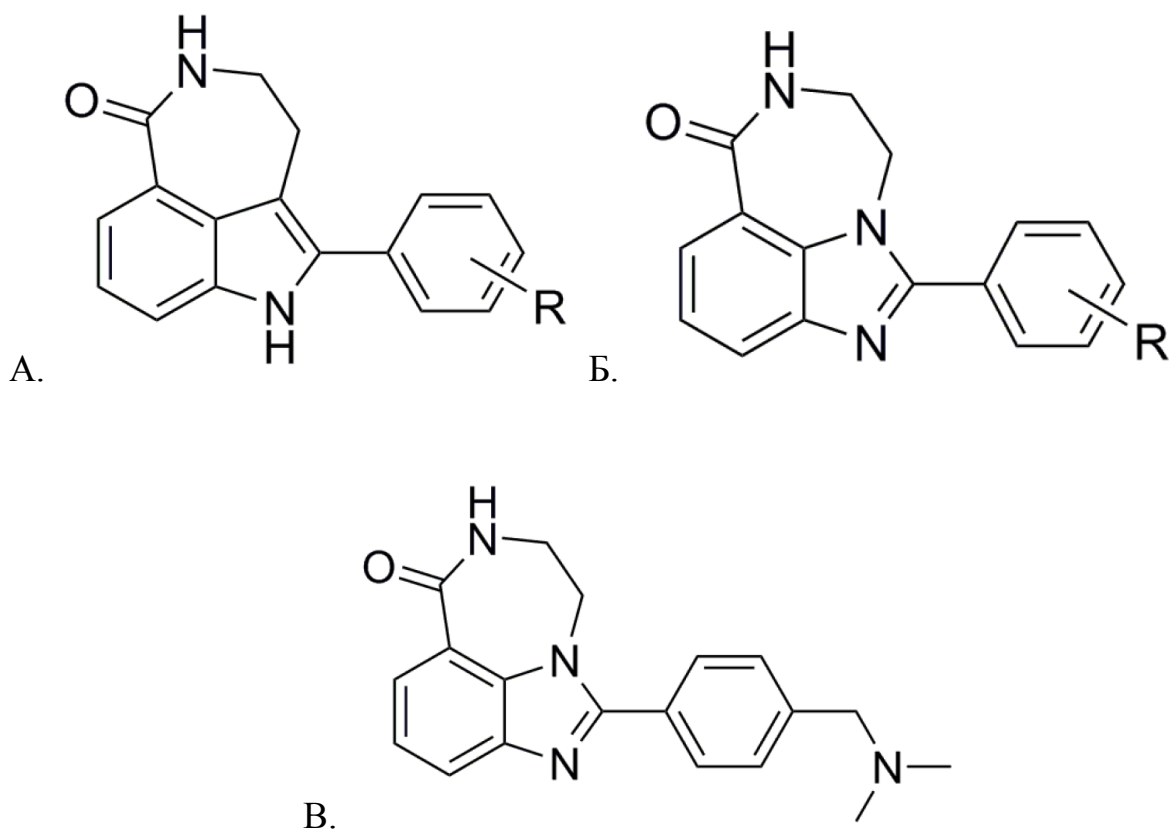


Рис. 1.7. Структура інгібіторів PARP третього покоління: А. Трициклічні лактам-індоли, Б. трициклічні лактам-бензimidазоли, В. AG14361

В цих сполуках карбоксамідна група утримується в потрібній орієнтації в НАД⁺-зв'язуючому сайті фермента, при цьому молекула інгібітору утворює додаткові водневі зв'язки з протеїном. Завдяки своїй конформації лактатного кільця у такого виду зв'язків відбувається максимальне зближення лактатної карбонільної і NH-груп з серином 904 та гліцином 863 фермента і утворення між ними водневих зв'язків. Крім того, залишки тирозину 907, 889 та 896 в каталітичному домені PARP можуть взаємодіяти з бензimidазольним ядром і замісником в положенні С2 цих з'єднань [240]. На даний час саме інгібітори третього покоління розглядаються в якості медичних препаратів спрямованих на лікування онкологічних захворювань. До інгібіторів третього покоління, які були стверджені до проведення

клінічних випробувань, відносять: веліпаріб, олапаріб, рукапаріб, нірапаріб, талазопаріб, паміпаріб [243, 244].

Проведений скринінг досліджуваних сполук, можливих інгібіторів PARP-1, відкриває нові можливості для цілеспрямованого синтезу селективних інгібіторів цього ензиму, які б володіли цитопротекторними властивостями та знайшли застосування в якості фармакологічних препаратів. Більше того, вибрані ефективні інгібітори PARP-1 повинні не спричиняти розвиток побічних ефектів, або проявляти незначні, які не впливають на функціонально-важливі біохімічні процеси. Тому для наших досліджень були вибрані два відмінні за своєю структурно інгібітори PARP-1 першого та другого покоління, як НАМ, та ІХД відповідно.

У зв'язку із вищезазначеним, пошук нових інгібіторів PARP-1 та з'ясування інших можливих механізмів їх дії є перспективним та актуальним, що сприятиме більш ґрунтовному розумінню шляхів залучення PARP-1 до регулювання клітинних функцій, які можуть здійснюватися як на рівні метаболічної регуляції, так і на рівні сигнальних шляхів.

Тому проведення щодо вибраних нами інгібіторів PARP-1 не тільки дозволить встановити ефективність їх дії на процеси полі-АДФ-рибозилування в мозку діабетичних щурів, але і з'ясувати на які інші процеси чи функціонально-активні показники вони впливають, тобто встановити чи існує зв'язок з іншими метаболічними процесами.

Тому проведення досліджень з використанням обраних інгібіторів НАМ та ІХД є доцільним, оскільки дають змогу порівнять ефективність їх дії за умов діабетичної нейропатії.

Розділ 2. Матеріали та методи досліджень

2.1. Реагенти та матеріали

Під час роботи було використано такі реактиви: стрептозотоцин (Sigma, США), ізохіноліндіол (Sigma, США), нікотинамід (Sigma, США), гідроген пероксид (Sigma, США), 3,4,5-диметилтіазол-2,5-дифенілтетразоліум бромід (Sigma-Aldrich, США) моноклональні антитіла анти-полі(АДФ-рибоза) (Trevigen, США), анти-інсулін (Millipore, США), анти-CtBP (Santa Cruz Biotechnology, США), анти- β -актин-пероксидаза (Sigma-Aldrich Co. LLC), анти-ламін В1 (Abcam, Великобританія), анти- β -актин-пероксидаза (Abcam, Великобританія), поліклональні антитіла анти-PARP (Cell Signaling Technology, США), анти-каспаза-3 (Santa Cruz Biotechnology, США), анти-CIPT1 (Everest Biotech, Великобританія) та вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому кролик проти миші IgG, кон'югат пероксидази (Sigma-Aldrich Co. LLC), козел проти кролика IgG, кон'югат пероксидази (Sigma-Aldrich Co. LLC). Усі інші реактиви виробництва Sigma (США), Pierce (США), Fermentas (Литва) та вітчизняного виробництва класу х.ч. та ч.д.а. Для приготування водних розчинів використовували дистильовану або деіонізовану воду з питомим опором близько 18 МОм/см.

2.2. Обладнання

Дослідження проведено із використанням наступних приладів: протоковий цитофлуориметр COULTER EPICS XL (Beckman Coulter, США), флуориметр FL800 (Biotek, США), світлові мікроскопи Olympus BX-15 (Olympus, Японія) та Olympus CX41 light microscope (Olympus, Німеччина), установка для електрофорезу та електропереносу Mini-Protein III (Bio-Rad Laboratories, США), ультразвуковий дезінтегратор Labsonic M (Sartorius, Німеччина), автоматичний спектрофотометр μ Quant (Biotek, США),

спектрофотометр СФ-46 (ЛОМО, Росія), сцинтиляційний спектрометр SL 20 (INTERTECHNIQUE, Франція), центрифуга Mikro 200R (Hettich, Німеччина), ваги електронні WPS 110/C/2 (RADWAG, Польща), шейкер – термостат ES – 20 (BIOSAN, Німеччина) та ін.

2.3. Моделювання експериментального ЦД 1 типу та схема введення нікотинаміду (НАМ) та 1,5- ізохіноліндіол (ІХД)

Дослідження проводили у інтактних щурах-самцях лінії Wistar масою тіла 100-125 г, за умов експериментального ЦД 1 типу. 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).

Експериментальний ЦД 1 типу у щурів моделювали шляхом одноразового внутрішньочеревинного введення СТЗ у дозі 70 мг/кг, який розводили у 0,1 М цитратному буфері, рН 4,5 [115].

Після 10 тижнів розвитку діабету у щурів здійснювали забір крові вранці після голодування (12 год) під легким ефірним наркозом із ретробульбарного венозного синусу ока. Концентрацію глюкози в крові визначали за допомогою глюкометра Precision Xtra Plus (MediSense UK Ltd., Велика Британія). У дослідженнях використовували діабетичних щурів із рівнем глюкози крові вище 17 ммоль/л.

Тварини були розподілені на 4 групи: контрольна група, діабетична група та діабетична група щурів яким вводили НАМ або ІХД у дозі 100 мг/кг та 5 мг/кг відповідно протягом 14 діб. Щурам контрольної групи такої ж

ваги, статі та таким же чином вводили 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера, рН 4,5.

2.4. Одержання сироватки крові щурів

Сироватку крові отримували центрифугуванням цільної крові при 3000 g протягом 7 хв. До використання сироватку крові зберігали при температурі - 80 °С.

2.5. Одержання лейкоцитів з периферичної крові щурів

Лейкоцити одержували в день експерименту з периферичної крові піддослідних тварин гемолізом еритроцитів. Процесу згортання запобігали, попередньо додавши гепарин у концентрації 50 МО. Гепаринізовану кров змішували з холодним лізуючим розчином (0,15 М/л NH_4Cl , 1 мМ/л KHCO_3 , 0,1 мМ/л ЕДТА, рН 7,2-7,4) у співвідношенні 1:20, ретельно струшували та інкубували 10 хв при температурі 37 °С. Зразки еритроцитів, після закінчення часу лізису, центрифугували при 400 g протягом 5 хв для осадження лейкоцитів. Відбирали супернатант, після чого осад двічі промивали фізіологічним розчином та центрифугували при 400 g протягом 5 хв. Промитий осад ресуспендували до концентрації 2×10^6 кл/мл у фосфатно-сольовому буфері PBS рН 7,2.

2.6. Оцінка перерозподілу між різними популяціями лейкоцитів крові щурів

Перерозподіл між різними популяціями лейкоцитів проводили з використанням двох параметрів протокового цитофлуориметру: розмір (за величиною прямого світлорозсіювання) та гранулярністю (за бічним світлорозсіюванням SS), рис. 2.3. Оцінку проводили на протоковому цитофлуориметрії COULTER EPICS XL (Beckman Coulter, США).

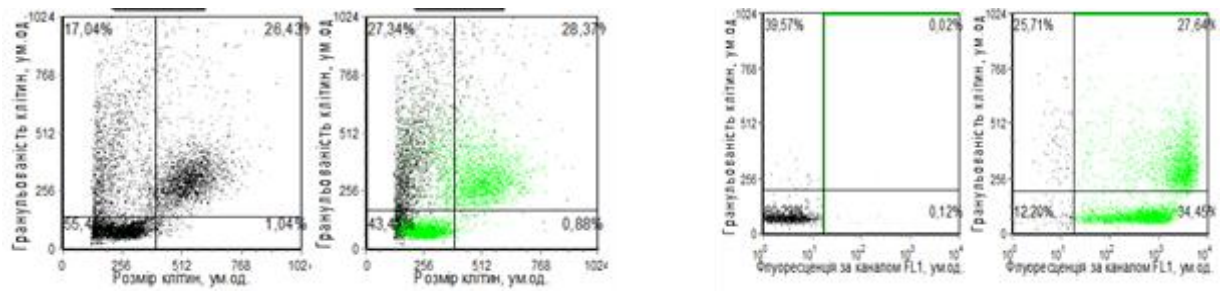


Рис. 2.1. Типова гістограма розподілу між популяціями лейкоцитів за величиною прямого (FS) та бічного світлорозсіювання (SS).

2.7. Оцінка рівня оксидативного стресу та життєздатності лейкоцитів крові щурів

ОС у клітинах визначали за рівнем АФК, який оцінювали використовуючи 2',7'-дихлорофлуоресцеїн діацетат у концентрації 25 мкмоль/л, згідно методу [122] з використанням власної модифікації, де інтенсивність флуоресценції 2',7'-дихлорофлуоресцеїн діацетату прямопропорційна вмісту АФК у клітинах. Інтенсивність випромінювання випробовуваних зразків фіксували за каналом FL1 (535-515 нм), рис. 2.1.

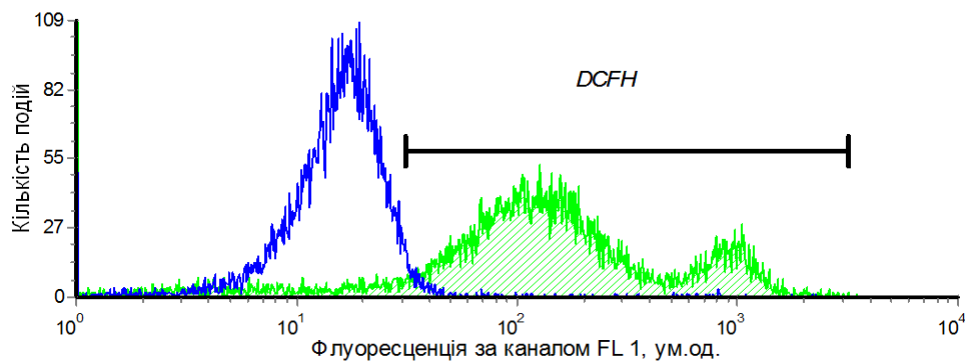


Рис. 2.2. Типова гістограма інтенсивності флуоресценції 2',7'-дихлорофлуоресцеїн діацетату за каналом FL1 log

Життєздатність клітин оцінювали за каналом FL3 (620-630 нм), використовуючи ядерний флуоресцентний зонд пропідій йодид (PI) (P4170, Sigma-Aldrich, США) у концентрації 10 мкг/мл (рис. 2.2), що надходить лише у мертві клітини та у клітини з пошкодженою цитоплазматичною мембраною [123].



Рис. 2.3. Типова гістограма розподілу між популяціями лейкоцитів за величиною прямого (FS) та бічного світлорозсіювання (SS) Дослідження проведено за допомогою використання протокового цитофлуориметру COULTER EPICS XL (Beckman Coulter, США). Було проаналізовано більше 10 000 подій з кожного зразку. Оцінку результатів проводили з використанням програмного забезпечення FCS Express V3.

2.8. Визначення активності супероксиддисмутази в сироватці крові щурів

Активність супероксиддисмутази (СОД, 1.15.1.1) визначали у сироватці крові щурів згідно з методом [116]. Метод ґрунтується на здатності супероксиддисмутази конкурувати з нітротетразолієм синім за супероксидні аніони, які утворюються в результаті аеробної реакції НАДН₂ і феназинметасульфату. Нітротетразолій синій в результаті цієї реакції відновлюється з утворенням гідразинтетразолію. Відсоток відновлення нітротетразолію синього знижується в присутності СОД.

Для дослідження використовували гомогенат печінки або 0,250 мл плазми. Досліджуваний зразок попередньо Проводили попередню обробку досліджуваного зразка 0,075 мл етанолу і 75 мг КН₂РО₄ з подальшим центрифугуванням при 6000 об/хв протягом 30 хв. До 0,1 мл супернатанту додавали 0,65 мл фосфатного буферу рН=8,3 з концентрацією 0,1 моль/л, 0,5 мл 0,02 % розчину нітротетразолію синього, 0,150 мл 0,007 % розчину феназинметасульфату і 1 мл 0,2 мМ розчину НАДН₂. Проби 10 хв витримували в темряві й фотометрували на спектрофотометрі при довжині

хвилі 540 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм проти проб, до яких не додавали розчин НАДН₂. Контролем служили проби, в яких замість плазми було 0,1 мл фосфатного буферу.

Активність ензиму розраховували за наступними формулами: спочатку оцінювали його здатність інгібувати відновлення нітротетразолію синього.

Відсоток інгібування розраховували за формулою:

$$T = (E_k - E_d) \cdot 100/E_k,$$

де T – відсоток інгібування; E_к – екстинкція контрольної проби;

E_д – екстинкція дослідної проби.

Після чого розраховували активність ензиму за формулою:

$$A_{\text{сод}} = T / (100 \% - T), \quad (2.4)$$

де A_{сод} – активність супероксиддисмутази; T – відсоток інгібування.

2.9. Визначення вмісту цитокінів у сироватці крові щурів

Оцінку вмісту цитокінів (ГМ-КСФ, ІФН-γ, ІЛ-4 та МХР-1) у сироватці крові досліджуваних щурів проводили з використанням мультиплексного набору Rat Cytokines 6plex FlowCytomix Multiplex (BMS825/3FF, eBioscience, США), який містив сферичні часточки різного діаметру із антитілами проти ГМ-КСФ (B9), ІФН-γ (B8), ІЛ-4 (B10) та МХР-1 (A8). Визначення проводили за використання протокового цитофлуориметру COULTER EPICS XL (Beckman Coulter, США), який оснащений аргонним лазером за λзбудж. = 488 нм. Обробку результатів проводили за допомогою програмного забезпечення FCS Express V3 (De Novo Software, США).

2.10. Визначення концентрації сечової кислоти та креатиніну в сироватці крові щурів

Визначення концентрації сечової кислоти проводили із використанням фосфорно-вольфрамового реактиву та визначення креатиніну проводили пікратним методом за допомогою наборів «Філіст-Діагностика»

(Дніпропетровськ, Україна) [134, 135]. За результатами визначення концентрації сечової кислоти і креатиніну в сироватці крові натще і в добовій сечі обчислювали величини добової екстракції і кліренс сечової кислоти і креатиніну (мл/хв) використовуючи формулу:

$$\frac{U \cdot V}{P \cdot 1440'}$$

де: U – концентрація досліджуваної сполуки у сечі (ммоль/л); P – її концентрація в сироватці крові (ммоль/л); V – об'єм добової сечі (мл); 1440 – кількість хвилин у добі.

2.11. Визначення вмісту вітаміну С в сироватці крові та печінці щурів

Визначення концентрації вітаміну С проводили згідно з методом [119], який ґрунтується на здатності вітаміну С 2,6-дихлорфеноліндофенолу натрію (D1878, Sigma) тим самим зменшуючи інтенсивність забарвлення, що призводить до зниження абсорбції при 520 нм.

Вітамін С екстрагували з сироватки крові та печінки додаванням 10 % мета фосфорної кислоти у співвідношенні 1:1 (об/об) з подальшим центрифугуванням при 3500 g протягом 20 хв. До 0,6 мл супернатанту додавали по 0,3 мл цитратно-ацетатного буферного розчину рН 4,15 та перемішували. Після чого додавали 0,3 мл розчину у концентрації 0,1 мг/мл 2,6-дихлорфеноліндофенолу натрію і через 30 сек. вимірювали абсорбцію отриманого розчину при 520 нм. В якості компенсаційного розчину використовували дистильовану воду. В подальшому до зразків додавали декілька кристалів аскорбінової кислоти, перемішували та повторювали вимірювання при 520 нм.

Будували калібрувальну криву залежності різниці абсорбцій аскорбінової кислоти до та після додавання декількох кристаликів аскорбінової кислоти та їх концентрацій. Для побудування калібрувальної

кривої використовували аскорбінову кислоту у концентраціях 0 мкг/мл, 2 мкг/мл, 4 мкг/мл, 6 мкг/мл, 8 мкг/мл, 10 мкг/мл, 12 мкг/мл, 16 мкг/мл, 18 мкг/мл та 20 мкг/мл у 5 % розчину мета фосфornoї килоти. Концентрацію вмісту вітаміну С у досліджуваних зразках визначали використовуючи калібрувальну криву, у мкг/мл.

2.12. Визначення вмісту вітаміну Е у печінці щурів [213]

Гідроліз зразка спиртовим розчином КОН проводили в модифікації 2Н спиртовим розчином КОН з додаванням 0,1 г аскорбінової кислоти на водяній бані при 75 С в колбі зі зворотним холодильником протягом 30 хв. До охолодженого розчину додавали дистильовану воду та кількісно переносили в лійку для розділення. Неомілювані речовини екстрагували кількома порціями петролейного ефіру (фракція 40-70). Об'єднаний екстракт відмивали до нейтральної реакції, та видаливши рештки вологи розчинник вилучали, а неомілювані речовини попередньо розчинивши розділяли з використанням методу тонкошарової хроматографії. В якості сорбенту використовували силікагель марки ЛС 5/40 мкм (UV 254 нм) з додаванням 13 % гіпсу, елюент – суміш гексан : діетиловий ефір (70 : 30). Хроматографію проводили у темному місці без доступу світла. Плями токоферолу після повного висихання візуалізували в ультрафіолетовому світлі використовуючи «Хроматоскоп - М».

Для кількісного визначення токоферол екстрагували з сорбенту діетиловим ефіром, відділяли від сорбенту і позбавлялися розчинника використовуючи роторний випарювач. Зразок розчиняли в 3,5 мл 96 % спирту етилового, додавали реактив Еммері-Енгеля і вимірювали спектрофотометрично оптичну густину при 50 нм. Паралельно проводили випробування контрольного розчину, використовуючи замість

випробовуваного зразку 96 % спирт етиловий та використовували його в якості компенсаційного розчину.

Концентрацію токоферолу визначали за калібрувальним графіком який був побудований з використанням концентрацій вітаміну Е в межах від 5 мкг/мл до 30 мкг/мл.

2.13. Приготування лізату тканин

Тканини розтирали у фарфоровій ступці за присутності рідкого азоту. До наважки подрібненої тканини, додавали лізуючий RIPA буфер (20 ммоль/л Трис-НСІ, рН 7,6, 1 % тритон-Х100, 150 ммоль/л натрію хлорид, 50 ммоль/л фтори натрію, 0,2 % додецилсульфат натрію) суміш інгібіторів протеаз, з розрахунку 100 мкл RIPA буферу на 100 мг тканини. Лізис тканини проводили протягом 30 хв на льоді. Руйнування мембран проводили ультразвуком за допомогою іонізатора Lab Sonic M (Sartorius, ФРН). Процедуру проводили 2 рази (Cycle 0.8, Ampl. 50 %) по 20 сек. Лізати центрифугували протягом 15 хв при 12000 g. Надалі відбирали надосадову рідину (інтерфазу), до якої додавали 1/5 частину 5-ти кратного буферу Леммлі (60 ммоль/л Трис-НСІ рН 6.8, 2 % додецилсульфат натрію, 10 % гліцерин, 5 % β -меркаптоетанол, 0.01 % бромфеноловий синій) та прогрівали на киплячій водяній бані протягом 5 хв. До використання зразки зберігали при -80 °С.

2.14. Фракціонування та отримання ядерних протеїнів головного мозку щурів

Тканину мозку, масою 200-250 мг розтирали в рідкому азоті у фарфоровій ступці. Наважку 100 мг подрібненої тканини переносили у пробірку типу «Eppendorf» 1,5 мл, додавали по 0,9 мл 0,5% розчину NP40-PBS з сумішшю інгібіторів протеаз та фосфатаз (78443, Thermo Sci., США)

для лізису клітинної мембрани та перемішували протягом 20 хв на холоді. За цих умов ядра залишаються не ушкодженими, потім їх осаджували центрифугування при 14 000 g, + 4 °С, протягом 20 хв. Супернатант відбирали, а в осад вносили по 0,5 мл буферу RIPA (з сумішшю інгібіторів) та перемішували на протязі 5 хв на холоді. Руйнування ядерних мембран проводили ультразвуком за допомогою іонізатора Lab Sonic M (Sartorius, ФРН). Процедуру проводили 2 рази (Cycle 0.8, Ampl. 50%) по 20 сек. Осаджували залишки ядерних мембран за допомогою центрифугування при 14 000 g, + 4 °С, протягом 20 хв. Інтерфазу (ядерна фракція протеїнів) об'ємом 450 мкл відбирали у пробірки типу «Eppendorf» 0,6 мл. Надалі відбирали надосадову рідину (інтерфазу), до якої додавали 1/5 частину 5-ти кратного буферу Леммлі та прогрівали на киплячій водянній бані протягом 5 хв. До використання зразки зберігали при - 80 °С.

2.15. Визначення концентрації протеїнів за поглинанням в УФ-області

Визначення концентрації протеїнів проводили спектрофотометрично у кюветах з довжиною пробігу променю 1 см за допомогою спектрофотометру СФ-2000-02 (ОКБ Спектр, Росія), згідно методу [120]. Вимірювали оптичну густину при 280 та 320 нм, вміст протеїнів у зразку визначали за формулою: [протеїни, мг/мл]=(OD₂₈₀ - OD₃₂₀) x розведення.

2.16. Визначення концентрації протеїнів за методом Бредфорд [121]

Принцип методу Бредфорд базується на здатності протеїнів зв'язуватися з кумасі діамантовим синім G-250.

2.17. Визначення активності PARP-1 в ядрах головного мозку щурів

Активність полі-АДФ-рибозополімерази (PARP-1) визначали з використанням 8-¹⁴С-НАД⁺ згідно методу Tanigawa Y та ін. [124]. Стандартна реакційна суміш (кінцевий об'єм 0,2 мл) для визначення полі(АДФ-

рибозо)полімеразної активності містила аліквоту свіжовиділених ядер (120 мкг), 100 мкмоль/л $8\text{-}^{14}\text{C}\text{-НАД}^+$, 50 ммоль/л трис-НСІ буфер, рН 7,5 та 1 ммоль/л дитіотреїтол. Проби інкубували 15 хв при 36 °С. Реакцію зупиняли додаванням 3 мл охолодженої 10 %-ної трихлороцтової кислоти (ТХО). Кислото-нерозчинний матеріал збирали на фільтри Millipore з діаметром пор 0,4 мкм та промивали 30 мл 10 %-ної ТХО. Фільтри висушували та радіоактивність підраховували у діоксановому сцинтиляторі. Активність ферменту виражали у ммольях зв'язаної з кислотно нерозчинним матеріалом радіоактивності АДФ-рибозного фрагменту $8\text{-}^{14}\text{C}\text{-НАД}^+$ за 1 хв на 1 мг протеїну ядер.

2.18. Електрофорез протеїнів у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію [125]

Для проведення електрофоретичного розділення протеїнів зразки тканинних лізатів вирівнювали за концентрацією протеїну та прогрівали при температурі 95 °С на протязі 5 хв в буфері Леммлі для зразків (62,5 ммоль/л Трис-НСІ (рН 6,8), 10 % гліцерин, 5 % β -меркаптоетанол, 1 ммоль/л ЕДТА, 2 % ДСН, 0,4 % бромфеноловий синій). Електрофорез проводили в Трис-гліциновому буфері рН 8,3 (25 ммоль/л Трис-НСІ, 192 ммоль/л гліцину, 0,1 % додецилсульфату натрію) в режимі 0,03 мА на дві пластинки гелю протягом 3-4 годин, для проведення дослідження використовували камеру для електрофорезу Mini-PROTEAN II (BIO-RAD, Швеція). Електрофорез протеїнів проводили у 8-10 % поліакриламідному гелях (ПААГ), за присутності додецилсульфату натрію (ДСН) в буферній системі Леммлі для подальшого імуноблот-аналізу. Для визначення молекулярної маси протеїнів використовували стандарти молекулярних мас на електрофореграмах фірми Fermentas (Литва) та Thermo Scientific (США).

2.19. Імуноблот-аналіз протеїнів [126]

Метод ґрунтується на перенесенні протеїнів з поліакриламідного гелю (ПААГ) на нітроцелюлозну мембрану під дією електричного струму із

наступною обробкою отриманих блотів антитілами. Імунореактивні зони виявляли за допомогою реакції хемілюмінесценції. Блотинг протеїнів на мембрану (RPN 203D, GE Healthcare, Amersham Bioscience) проводили в апараті Mini Trans-Blot Cell (BIO-RAD, Швеція) при напрузі 100 В протягом 90 хв у буфері для переносу, що містив: 25 ммоль/л Трис-НСІ, рН 8,3, 20 % метанол, 192 ммоль/л гліцин, 0,1 % ДСН. По закінченню мембрани промивали дистильованою водою та прокрашували 1 % розчином барвнику Ponceau S, приготовленого на 3 % ТХО 5-10 хв. Надалі вільні центри зв'язування на мембрані блокували протягом 1 год 5 % сухим знежиреним молоком (20-241, APEX Research, Inc.) у буфері PBS із додаванням 0,1 % tween 20. У подальшому мембрану інкубували з первинними антитілами у буфері для блокування протягом ночі при 4 °С з наступним промиванням PBSt тричі по 5 хв. В якості вторинних антитіл використовували анти-мишачі або анти-кролячі IgG, кон'юговані з пероксидазою хрому в розведенні 1:1000 у буфері для блокування. Інкубацію з вторинними антитілами проводили протягом 1 год при кімнатній температурі, після чого мембрану відмивали PBSt тричі по 5 хв. Імунореактивні смуги на блотах виявляли за допомогою розчину 1,25 ммоль/л люмінолу (5-аміно-2,3-дигідро-1,4-фталазіндіону) (123072, Sigma, США), 2,72 ммоль/л кумарову кислоту (4-гідроксицинамінова кислота) (C9008, Sigma, США) та 0,01 % розчин гідроген пероксиду в 0,1 М Трис-НСІ буфері рН 8,5. Час експозиції оброблених мембран на рентгенівській плівці залежав від інтенсивності хемілюмінесценції і тривав 1-15 хв. Для проявки плівки використовували реактиви Carestream Kodak, а саме проявник (P7042-1GA, Sigma-Aldrich, США) та фіксатор (P7042-1GA, Sigma-Aldrich, США). Денситометричний аналіз проведено за допомогою програмни TotalLab TL120 (Nonlinear Inc, США), вміст протеїну виражений в умовних одиницях (ум. од.).

2.20. Визначення експресії мРНК PARP-1 у головному мозку щурів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції

Полімеразна ланцюгова реакція із зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) – це експериментальний метод молекулярної біології, який використовується для ампліфікації, виділення або ідентифікації відомої послідовності мРНК. Для цього сумарну РНК з 100 мг подрібненої тканини отримували за допомогою набору реагентів Trizol (T1044, Isogene, Росія), згідно протоколу виробника. Отримання кДНК (кДНК) та полімеразну ланцюгову реакцію проводили згідно з [127]. РНК осаджували розчином 2-пропанолу, промивали двічі 75 % етанолом та розчиняли у воді, що не містила домішок рибонуклеаз. Експресію мРНК PARP-1 досліджували методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції, із детекцією продуктів у реальному часі, згідно методики [128]. Для цього тотальну РНК із тканин використовували як матрицю для синтезу комплементарної ДНК з допомогою набору "QuantiTect Reverse Transcription" (QIAGEN, Німеччина), який забезпечував елімінацію можливих залишків геномної ДНК. Отриману кДНК використовували для проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Для ампліфікації мРНК PARP-1 використовували наступні праймери: прямий 5'-AAGGTCAAGAAGACCGCAGA-3' зворотній 5'-AGAGGAGGCTAAAGCCCTTG-3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 312-331 та 624-605 кДНК PARP-1 щурів (GenBank номер NM_013063). Розмір ампліфікованого фрагмента 312 пар нуклеотидних залишків. Експресія мРНК β-актину слугувала додатковим контролем кількості РНК, взятої для аналізу. Для ампліфікації мРНК β-актину використовували наступні праймери: прямий 5'-CGTACCACTGGCATCGTGAT-3' та зворотній 5'-GTGTTGGCGTACAGGTCTTT-3'. ПЛР проводили на апараті "Stratagene Mix 3000P cycler" (США), використовуючи SYBRGreen Mix (AB gene, Великобританія). Для проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції використовували по три незалежно виділених препарати РНК. Аналіз

результатів виконували з допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Differential expression calculator", статистичний аналіз – за допомогою програми *MS Excel*.

2.21 Визначення вмісту цитохрому P450 2E1 (CYP 2E1) у печінці щурів

Вміст білка CYP2E1 у лізаті печінки визначали методом Вестерн-блот аналізу, використовуючи специфічні поліклональні антитіла, отримані до білка CYP2E1 миші. В якості контролю навантаження був використаний гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназа (GAPD), імуноблотинг якого проводили з використанням поліклональних антитіл. Для визначення концентрації білка у клітинному лізаті застосовували метод Бредфорда [129]. Електрофоретичне розділення білків проводили у 12 % ПААГ (з 0,1 % натрію додецилсульфату) за методом Леммлі [130]. Відразу після електрофорезу був проведений електроперенос білків на нітроцелюлозну мембрану. Після блокування в буфері TBST, що містив 5% знежиреного сухого молока, мембрану інкубували з антитілами до CYP2E1 (1/400, v/w), а потім з антикролячими IgG вторинними антитілами (A6154, Sigma, 1/5,000 v/w). Білок CYP2E1 був візуалізований за допомогою хемілюмінесценції. Кількість білка CYP2E1 виражено у відносних одиницях, які вираховували як відношення вмісту білка CYP2E1 до вмісту контрольного білка β -актину на тій самій смужці гелю. Кількість білка оцінювали за інтенсивністю смуг, що вимірювали денситометричним методом, застосовуючи комп'ютерну програму Totallab TL120.

2.22. Визначення вмісту НАД⁺ та співвідношення вільних НАД⁺/НАДН у головному мозку щурів

Визначення вмісту НАД⁺, лактату, пірувату, а також розрахунок співвідношення НАД⁺/НАДН, з урахуванням концентрації відповідних метаболітів та констант рівноваги дегідрогеназ, проводили у тканинах

головного мозку та печінки щурів згідно методів [117]. Методи ензиматичного визначення вмісту коензимів та метаболітів в кислотних депротейнізованих екстрактах тканин щурів ґрунтуються на відновленні НАД⁺ або окисненні НАДН у відповідних дегідрогеназних реакціях та реєстрації змін оптичної густини. Реакцію проводили безпосередньо в кюветі спектрофотометра. Після вимірювання початкової екстинції проб, реакцію ініціювали внесенням в контрольну і дослідну кювети певної кількості ензиму, підібраної таким чином, щоб ця кількість була достатньою для повного завершення реакції через 15-20 хв. Відсутність змін оптичної густини в наступні 3 хв свідчила про закінчення реакції. Вміст метаболітів розраховували згідно формули:

$$X = \frac{\Delta E \cdot P \cdot V}{\epsilon \cdot \alpha \cdot d}$$

ΔE - різниця оптичної густини; α - об'єм екстракту, що внесли в кювету, мл; V – об'єм реакційної суміші, мл; P – кінцеве розведення проби; ϵ - коефіцієнт молярної екстинції, який становить 6,22 см²/мкмоль при довжині хвилі 340 нм; d – довжина світлового шляху в кюветі, 1 см.

Визначення окислених та відновлених форм НАДФ та НАДФН.

Вміст окислених форм НАДФ в аліквотах екстрактів тканин, що досліджувались, визначали спектрофотометричним методом за їх специфічним відновленням в НАДФН в процесі окислення етанолу в ацетальдегід, що каталізується алкогольдегідрогеназою, у випадку НАД та окислення глюкозо-6-фосфату в 6-фосфоглюконову кислоту, що каталізується глюкозо-6-фосфатдегідрогеназою (К.Ф. 1.1.1.49) у випадку НАДФ.

При визначенні вмісту НАД для кількісного його окислення етанолом повинні бути вилучені продукти реакції: протони зв'язуються в лужному середовищі, а ацетальдегід зв'язується семікарбазидом.

Експериментальна кювета вміщувала: 2,0 мл 0,1 М натрій пірофосфатного буферу, рН 8,8, що містив 0,5% семікарбазид; 1,0 мл екстракту тканини; 0,05 мл 96% етанолу; контрольна - натрій пірофосфатний буфер відповідного об'єму. Після перемішування та виміру початкового значення оптичної густини, реакцію ініціювали внесенням у обидві кювети по 0,02 мл розведеного препарату алкогольдегідрогенази, який містив 1,2 мг білку/мл і реєстрували зміни величини оптичної густини через кожну хвилину до повного завершення реакції (3-5 хв).

Рівновага реакції при визначенні вмісту НАДФ сильно зміщена у бік утворення 6-фосфоглюконату.

Експериментальна кювета містила: 1 мл 0,4 М триетаноламінового буферу, рН 7,62; 0,1 мл 0,1М $MgCl_2$; 2,0 мл екстракту тканини (в контроль відповідно 2,0 мл води); 0,1 мл 0,25М глюкозо-6-фосфату. Проби перемішували і реєстрували величину оптичної густини. Після виміру початкової оптичної густини у обидві кювети вносили по 0,02 мл суспензії глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Fluka)Г-6-ФДГ, яка містила 1 мг білку/мл і реєстрували зміни величини оптичної густини до повного завершення реакції (3-5 хв).

Вміст окислених нікотинамідних динуклеотидів (в мкмоль/г тканини) розраховували за формулою вказаною вище.

Вміст відновлених форм НАДФН в аліквотах екстрактів тканин, що досліджувались, визначали спектрофотометричним методом за їх специфічним окисненням в НАДФ.

При визначенні вмісту НАДН у пробірку з притертою пробкою, що містила 4 мл 0,5 н КОН на етанолі вносили 200-400 мг порошку тканини та нагрівали напротязі 60 сек при 70 °С на водяній бані, після чого зразу ж охолоджували на льоду. Після 10 хв витримання на льоду вносили 2,8 мл триетаноламін-НСІ-фосфатної суміші. Витримували ще 20 хв при кімнатній

температурі для осадження білків, які відділяли центрифугуванням на протязі 45 хв при 6000 об/хв. Одержаний екстракт використовували як для визначення НАДН так і для - НАДФН у одній кюветі.

Вміст НАДН визначали за його специфічним окисненням в НАД в процесі відновлення пірувату в лактат, що каталізується лактатдегідрогеназою, а вміст НАДФН визначали за його специфічним окисненням в НАДФ в процесі відновлення α -кетоглутарату в глутамат, що каталізується глутаматдегідрогеназою.

Оскільки глутаматдегідрогеназа реагує майже однаково швидко з НАДФН і НАДН, то для визначення НАДФН спочатку окислювали НАДН лактатдегідрогеназою та піруватом.

Експериментальна кювета містила: 1,0 мл 1/15 М фосфатного буферу, рН 7,8; 2,0 мл екстракту тканини; 0,01 мл субстратної суміші (10 мг α -кетоглутарату, 13 мг пірувату, 7 мг NH_4Cl в 0,1 мл 1/15 М фосфатному буфері). Контрольна - розчин двохромовокислого калію.

Після перемішування та реєстрації початкової оптичної густини у експериментальну кювету вносили 0,05 мл розчину лактатдегідрогенази (0,5 мл білку в 1 мл) і реєстрували оптичну густину через кожну хвилину на протязі 3 хв. Після чого вносили 0,05 мл глутаматдегідрогенази (20 мг білку в 1 мл) і реєстрували оптичну густину по завершенню реакції (10-15 хв).

Визначення вмісту лактату в тканинах.

Вміст лактату в досліджуваних тканинах визначали згідно. В присутності лактатдегідрогенази лактат перетворюється в піруват, причому зв'язування пірувату, що утворюється в процесі реакції з гідразинном сприяє повному окисненню лактату:



Вміст лактату (в мкмоль на 1 г свіжої тканини) розраховували згідно формули вказаної вище.

Визначення вмісту піровиноградної кислоти.

Визначення вмісту пірувату оснований на реакції, що каталізується лактатдегідрогеназою:



Рівновага реакції зміщена вправо. При допустимому для вимірювання надлишку НАДН піруват швидко перетворюється в лактат. Кількість використаного в реакції пірувату еквівалентна кількості НАДН, зменшення якого реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм.

2.23 Виділення колагену типу 1 з великогомілкових та малоогомілкових кісток щурів, визначення його амінокислотного складу

Тварин декапітували використовуючи пентабарбіталовий наркоз та вилучали великогомілкові та малоогомілкові кістки. Після чого було використано декілька методів виділення кісткового колагену та його очищення – екстракція нейтральними солями, кислотами та ферментними розчинами [131-133]. Після трьох разової демінералізації 0,5 М розчином динатрію-ЕДТА рН 7,4 протягом 24 годин при 4 °С шматочки кісток екстрагували 0,5 М розчином оцтової кислоти та центрифугували при 6000 g протягом 20 хв. Осад розчиняли в 0,5 М розчині оцтової кислоти в присутності 5 мМ розчину ЕДТА і пепсину (50 мг на 1 г тканини) рН 2,5 протягом 96 годин при 4 °С. Ферментативну реакцію зупиняли додаванням розчину натрію гідроксиду до встановлення рН 7,5. Осад отриманий центрифугуванням при 3500 g протягом 40 хв. Супернатант відбирали та додавали сіль натрію хлориду до кінцевої концентрації 4 М. Цей осад, який містив чистий колаген, розчиняли в 1 М розчині оцтової кислоти. Отриманий розчин діалізували проти 0,02 М розчину динатрію гідрофосфату протягом 24 годин при 4 °С та центрифугували при 6500 g протягом 60 хв. Чистоту

отриманого колагену контролювали електрофоретично. Фракції колагену піддавали гідролізу 6 М розчином хлористоводневої кислоти протягом 24 годин при 105 °С. Визначення амінокислотного складу отриманих гідролізатів проводили за допомогою катіонообмінної хроматографії на автоматичному амінокислотному аналізаторі ААА-881 (Чехія).

2.24. Статистична обробка результатів

Вірогідність розбіжностей між групами порівняння визначали методом однофакторного дисперсійного аналізу (one way ANOVA) з наступним тестом Bonferroni (post-hoc test) за допомогою комп'ютерної програми Origin v.9.0. Результати представлені у вигляді середнього значення (M) та стандартної похибки середнього значення ($\pm m$). Різницю вважали статистично вірогідною при $P < 0,05$.

Розділ 3. Показники розвитку патогенетичних процесів за ЦД 1 типу за введення НАМ або ІХД

3.1. Концентрація глюкози в крові та маса тіла тварин за ЦД 1 типу

Цукровий діабет є багатофакторним метаболічним захворюванням, яке супроводжується численними ускладненнями [2, 136].

Порушення вуглеводного обміну, метаболізму глюкози, зокрема призводить до збільшення концентрації глюкози у крові, що в кінцевому рахунку призводить до розвитку ЦД та численних його ускладнень, що супроводжується розвитком цілого каскаду патологічних процесів.

Для відтворення адекватної експериментальної моделі ЦД 1 типу у щурів був використаний стрептозоточин (СТЗ), який вводили шляхом одноразової інекції у концентрації 70 мг/кг маси тіла. Тварини були розподілені на 4 групи: контрольна група, діабетична група та діабетична група щурів яким вводили НАМ або ІХД. Після 10 тижнів розвитку діабету діабетичній групі щурів вводили НАМ або ІХД у дозі 100 мг/кг та 3 мг/кг відповідно протягом 14 діб.

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 збільшення її концентрації в крові діабетичної групи тварин після 12 тижнів, яка підвищувалася у 3,5 рази у порівнянні з тваринами контрольної групи, табл. 3.1. За цих умов також знижувалася маса тіла діабетичних тварин на 30 %. Зниження маси тіла тварин та підвищення концентрації глюкози в їх крові 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 крові. У контрольній групі щурів концентрація глюкози не змінювалася та залишилась на фізіологічному рівні $5,3 \pm 1,4$ ммоль/л.

Табл. 3.1. Динаміка зміни маси тіла тварин та рівня глюкози в крові щурів,
 $M \pm m$ (n = 6)

Групи	Маса тіла (г)			Глюкоза в крові (ммоль/л)		
	Початков а	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*

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

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

P<0,05 порівняно з групою «Діабет»

3.2. Розвиток оксидативного стресу (ОС) в лейкоцитах

На фоні підвищеної концентрації глюкози в крові, стану гіперглікемії, погіршується її засвоєння інсулінчутливими тканинами, в яких можуть виникати запальні процеси на що в першу чергу реагують лейкоцити. Лейкоцити відіграють важливу роль у розвитку процесів запалення, а їх адгезія до стінок артерій є передумовою виникнення атеросклерозу [137]. На даний час вважають, що ОС та запалення, а також нейрозапалення відіграють значну роль у патогенезі розвитку ЦД обох типів та його судинних ускладнень. Лейкоцити є досить неоднорідною за складом сукупністю клітин та їх типи відрізняються один від одного своїм походженням, морфологією, цитохімічними та функціональними властивостями. Зміни в їх перерозподілі можуть бути обумовлені змінами у системі крові зокрема реакцією кровотворного апарату на розвиток різноманітних патологічних станів [138,139]. Відомо, що підвищений рівень глюкози спричинює зниження 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 [140].

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 (рис. 3.1).

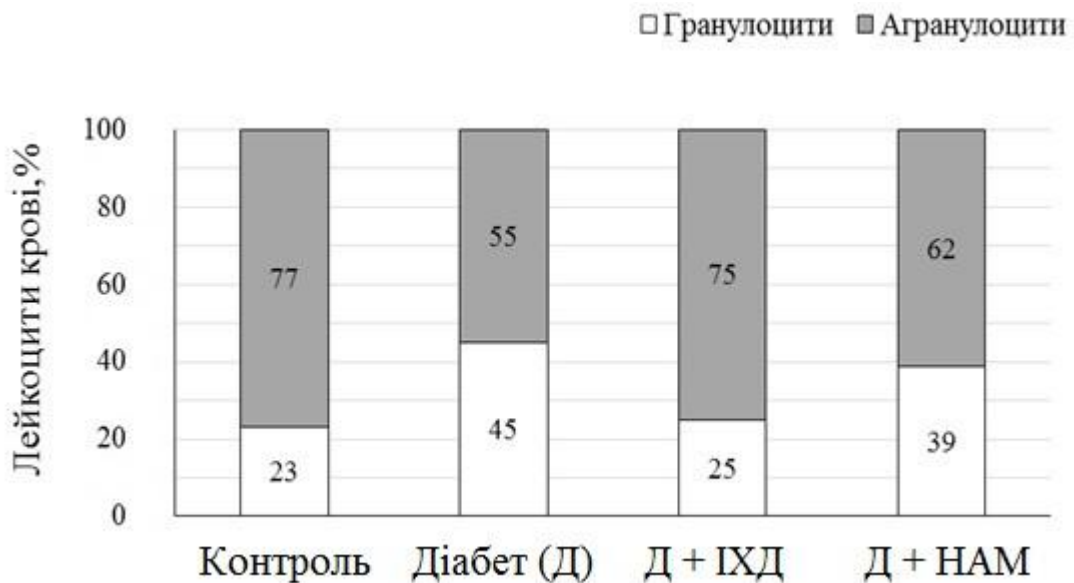


Рис. 3.1. Перерозподіл лейкоцитів крові у групах дослідних тварин $M \pm m$ ($n = 6$).

Після введення діабетичним щурам 1,5-ізохіноліндіол спостерігали відновлення рівноваги між кількістю гранулоцитів та агранулоцитів, в той час як за введення нікотинаміду було виявлено лише часткове відновлення стану рівноваги цього параметру.

Оскільки гіперглікемія слугує запуском до розвитку цілого каскаду патологічних процесів, то є велика ймовірність того, що в організмі тварин буде зазнавати змін баланс між про- та антиоксидантними системи захисту (супероксиддисмутаза, каталаза, вітаміни С та Е, глутатіонпероксидаза, тощо). Крім того, відомо, що розвиток різних патологічних процесів порушує цей баланс за рахунок посиленого утворення вільних радикалів та шляхом

зниження рівня доступних антиоксидантів. Наприклад, за ЦД 1 та 2 типу, який супроводжується ускладненнями, зокрема ішемічною хворобою серця, інфарктом міокарду, нефропатією тощо, підвищується рівень ОС викликаний дисбалансом у функціонуванні про- та антиоксидантних систем [141, 142].

Дійсно, було виявлено, що рівень АФК у лейкоцитах крові діабетичних щурів був вищим на 75 % у порівнянні із контролем, рис. 3.2. При цьому, введення НАМ або ІХД призводило до зниження рівня АФК в лейкоцитах на 25 % або 12 % відповідно, відносно діабетичної групи.

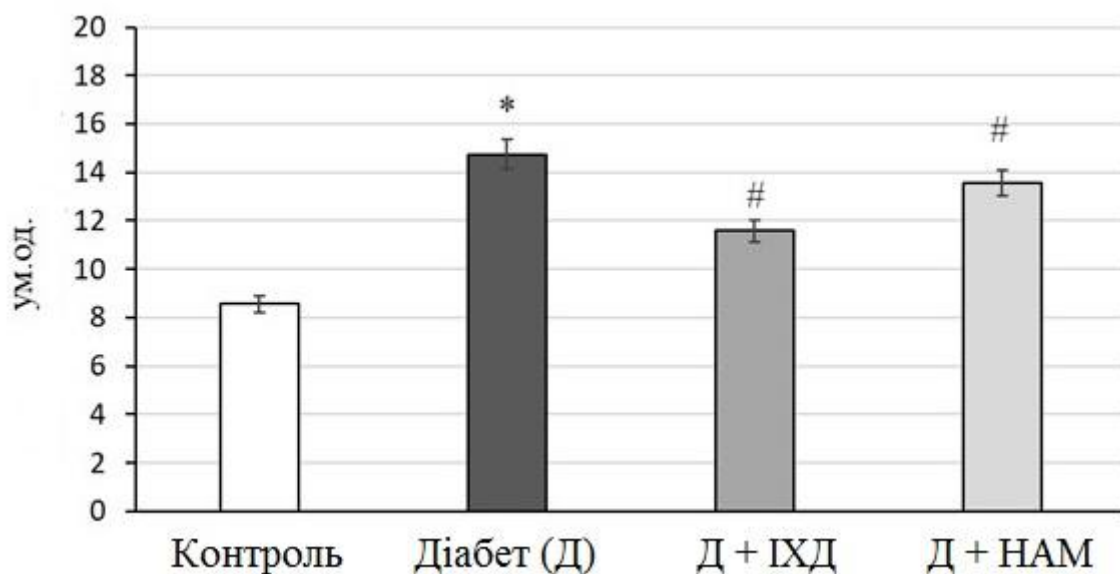


Рис. 3.2. Рівень АФК у лейкоцитах крові діабетичних щурів та на фоні введення 1,5-ізохіноліндіолу та нікотинаміду, $M \pm m$ ($n = 6$). $*P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет»

У той же час, незважаючи на те, що рівень АФК у лейкоцитах крові за введення НАМ був вищим, у порівнянні з групою якій вводили ІХД, НАМ проявляв більш виражену антиоксидантну дію, свідченням чого є зниження продукування АФК гранулоцитами на фоні введення даного препарату, рис. 3.3.

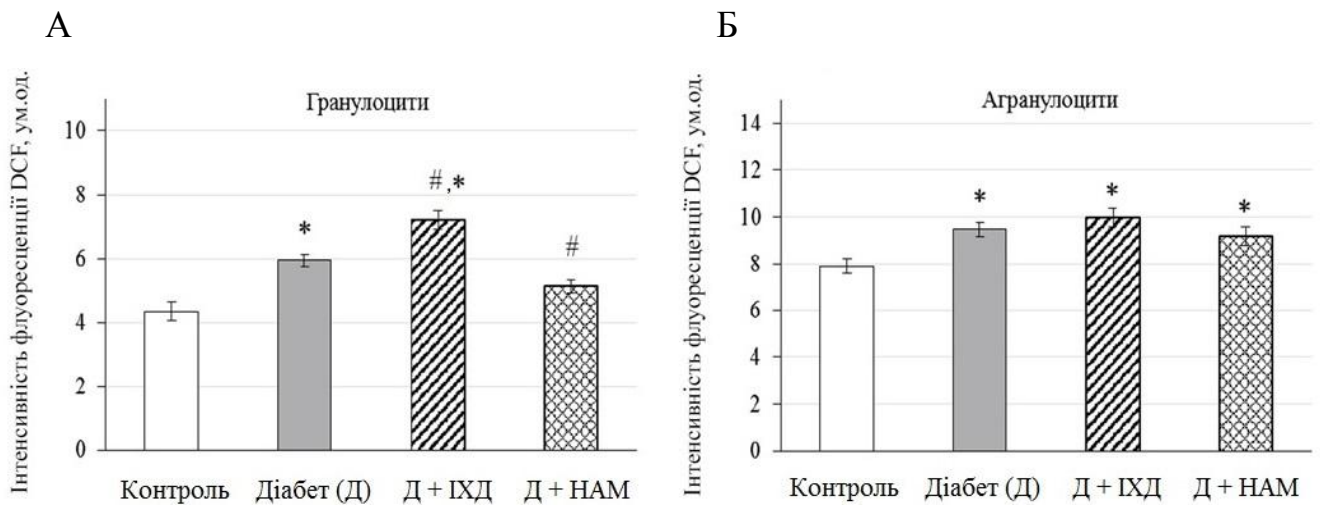


Рис. 3.3. Рівень АФК у гранулоцитах (А) та агранулоцитах (Б) крові діабетичних щурів за впливу на фоні введення 1,5-ізохіноліндіолу та нікотинаміду $M \pm m$ ($n = 6$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет»

Це можна пояснити тим, що в той час, як за введення досліджуваних інгібіторів діабетичним щурам рівень продукування АФК в агранулоцитах практично не змінювався у порівнянні з діабетичною групою, введення ж НАМ супроводжувалося зниженням рівня продукції АФК у гранулоцитах крові. На наш погляд, виявилось неочікуваним саме те, що введення ІХД сприяло розвитку ОС, про що свідчить зростання рівня АФК в гранулоцитах. Однак оскільки їх кількість в периферичній крові за введення ІХД діабетичним щурам була значно меншою, ніж у випадку з НАМ (рис. 3.1), невідповідність між даними представленими на рис. 3.2 та 3.3 може бути обумовлена саме різницею у перерозподілі гранулоцитів та агранулоцитів лейкоцитів крові.

При оцінці життєздатності лейкоцитів периферичної крові щурів показано, що розвиток ЦД 1 типу призводив до значного зниження кількості живих клітин у крові тварин у порівнянні з контрольною групою тварин (рис.

3.4), не виключено, що за рахунок пошкодження їх мембрани та розвитку апоптозу.

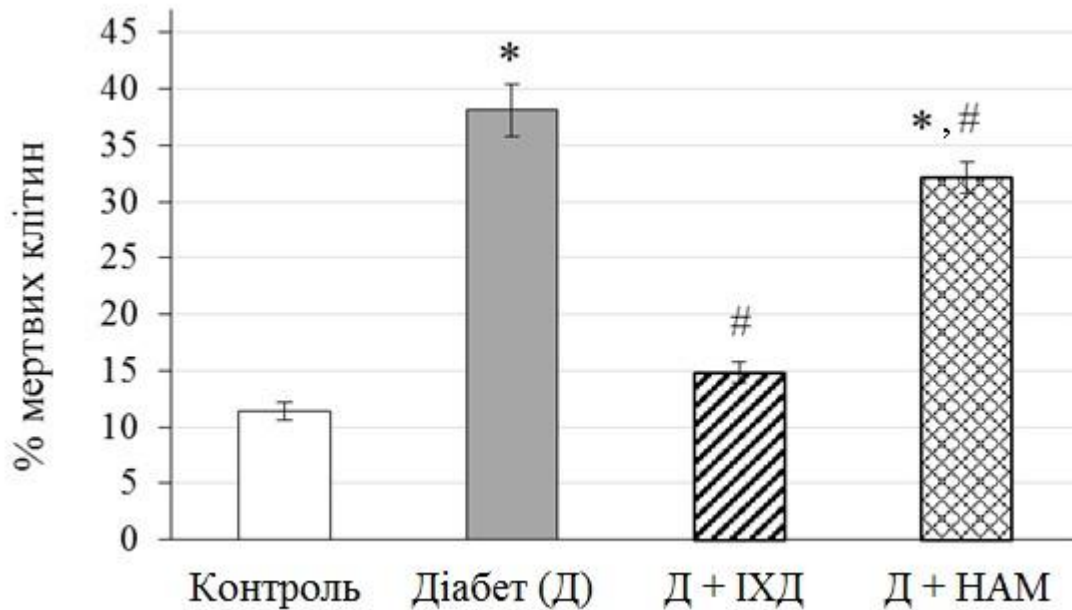


Рис. 3.4. Життєздатність лейкоцитів крові діабетичних щурів та на фоні введення 1,5-ізохіноліндіолу та нікотинаміду $M \pm m$ ($n = 6$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет»

Можна припустити, що, принаймні частково, загибель лейкоцитів зумовлена активацією апоптозу [143]. Оскільки активація процесів полі-АДФ-рибозилування залучена до патогенезу багатьох захворювань, зокрема артритів, ішемії, інсультів, серцево-судинних дисфункцій асоційованих з діабетом, різних форм запалення тощо [144-146], використання інгібіторів PARP-1 може бути врахованим при їх лікуванні. Дійсно вибрані нами інгібітори PARP-1 при їх двотижневому застосуванні, як виявилось, запобігали загибелі досліджуваних клітин крові, про що свідчать представлені на рис. 3.4 дані, причому ІХД мав більш виражену дію на життєздатність клітин лейкоцитів у порівнянні з НАМ.

Виявлений нами коригуючий вплив НАМ на життєздатність лейкоцитів крові може також бути реалізований шляхом підтримання

внутрішньоклітинного пулу H_2O_2 та контролю аутоімунних процесів, зокрема експресії генів HLA II класу, тим самим запобігаючи загибелі клітин. Крім того, НАМ здатен пригнічувати утворення цитокінів моноцитами та макрофагами. Так, було показано, що у терапевтичних дозах НАМ здатен знижувати продукування прозапальних цитокінів, як інтерлейкін 1 β , інтерлейкін-6, інтерлейкін-8, TNF- α в острівцевих клітинах підшлункової залози [147]. Не виключено, що нормалізуючий ефект НАМ на життєздатність лейкоцитів може також бути реалізованим і через його вплив на експресію гену стресорного протеїну p53, при цьому суттєво гальмуючи її або ж протидіючи H_2O_2 -залежному деацетилюванню p53, викликаному $\text{p}300$ [148]. Більш виражена дія ІХД обумовлена тим, що ця сполука є ефективним інгібітором NO-синтази, тим самим запобігаючи утворенню пероксинітриду.

Відомо, що за інтенсифікації ОС відбувається порушення рівноваги між прооксидантною та антиоксидантною системою. Тому, доцільним було оцінити активність супероксиддисмутази (СОД), одного із найважливіших ензимів антиоксидантного захисту. Разом з каталазою та іншими антиоксидантними ензимами СОД протидіє в організмі постійному утворенню АФК. СОД є каталізатором реакції дисмутації супероксиду в O_2 та пероксид водню. Таким чином, цей ензим відіграє важливу роль в антиоксидантному захисті практично всіх клітин, які перебувають у контакті з киснем. Було виявлено, що у сироватці крові діабетичних щурів у незначній мірі знижувалася активність СОД у порівнянні з показниками сироватки крові контрольної групи, що може бути пов'язано з надмірним навантаженням та виснаженням антиоксидантної системи за умов тривалої гіперглікемії (рис. 3.5).

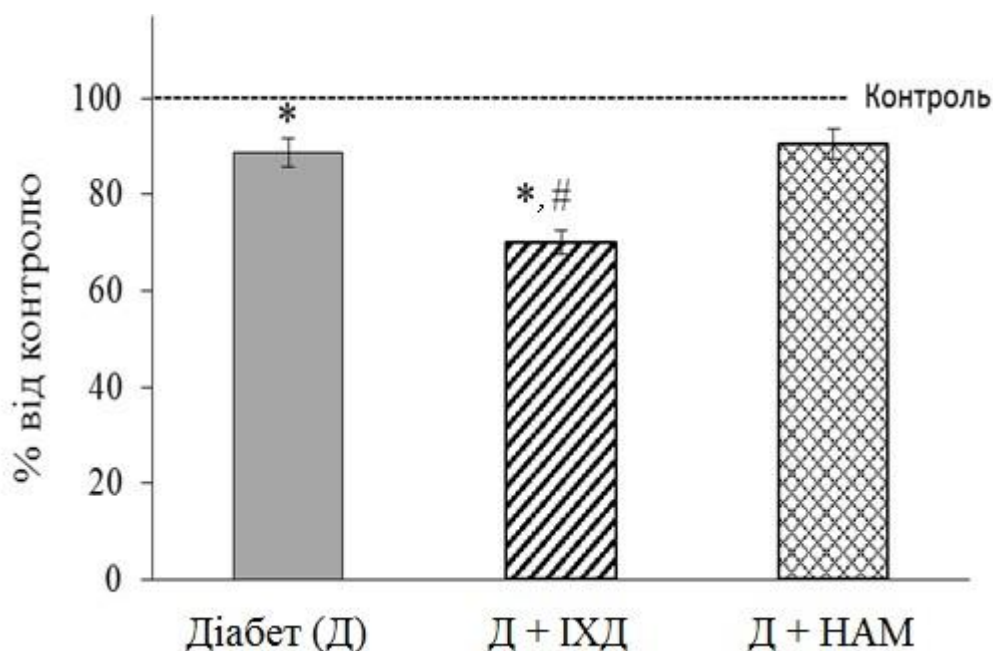


Рис. 3.5. Відносна активність СОД у сироватці крові діабетичних щурів та на фоні введення 1,5-ізохіноліндіолу та нікотинаміду, $M \pm m$ ($n = 6$). * $P < 0,05$ порівняно з контролем, який прийнятий за 100 %

Введення досліджуваних інгібіторів PARP-1 діабетичним щурам не призводило до нормалізації активності СОД, більше того, на фоні введення спостерігали ще у більшій мірі зниження активності ензиму на тлі введення ІХД, в той час як НАМ не впливав на його активність у порівнянні з діабетом. Тобто введення НАМ не пригнічувало навантаження на антиоксидантну систему.

Можна припустити, що здатність НАМ та його біологічно активних похідних впливати на розвиток ОС за цукрового діабету, здійснюється як шляхом їх впливу на перебіг процесів, що відбуваються на поверхні зовнішньої клітинної мембрани, так і на процеси, які протікають в ядрі клітин та цитозолі. Зважаючи, що НАМ запобігає деградації PARP-1 та сприяє репарації ДНК шляхом прямого інгібування каспази3, як показано для нейрональних клітин [149], є свідченням на користь того, що його цитопротекторний вплив на клітини крові щурів може також бути

реалізованим таким шляхом. Не дивлячись на те, що роль ІХД, як інгібітора NO-синтази вже доведена, існують дані, щодо його здатності інгібувати активність PARP-1 [150, 151]. Однак, не виключено що він здатен реалізувати свою дію впливаючи і на інші метаболічні шляхи.

Відомо, що ангіогенез залучений до патогенезу багатьох захворювань, у тому числі цукрового діабету за яких розвиток запальних процесів призводить до прогресування захворювання в результаті функціональних порушень у судинах та надмірного ангіогенезу в різних органах [152]. На даний час з'явилися нові дані, які вказують на те, що специфічному інгібітору PARP-1, ІХД властива здатність запобігати пухлинному метастазуванню а також запобігати інтенсифікації ангіогенезу при деяких типах ретинопатій [153]. Встановлено, що надактивація синтази NO (NOS-2) відіграє патогенетичну роль канцерогенезу та за розвитку запалених процесів [154, 155]. Було встановлено, що за умов *in vitro* в макрофагах миші ІХД здатен інгібувати акумулювання нітриту в середовищі інкубації та індукцибельну іNOS. Однак механізм інгібуючої дії ІХД за умов *in vitro* не узгоджується з існуючими даними за його хронічного введення. Тому цілком імовірно, що за умов наших досліджень ІХД буде реалізувати свою дію не лише в якості інгібітора PARP-1, але й через залучення інших механізмів. Незважаючи на те, що отримані дані не дають остаточної відповіді щодо конкретних механізмів посилення ОС в лейкоцитах, проте одним із механізмів його інтенсифікації може бути активація протеїнкінази С за умов високої концентрації глюкози, що продемонстровано деякими авторами [156].

За розвитку діабетичної нейропатії, яка супроводжується ОС, його інтенсифікація відбувається і у серцево-судинній системі. Гіперглікемія призводить до активації цілого ряду біохімічних процесів (аутоокислення глюкози, накопичення поліолів тощо) [54], а також може „запускати” надмірне утворення вільних радикалів.

При оцінці можливості залучення процесів інтенсифікації процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), як однієї з патогенетичних ланок у

розвиток порушень функціонування серцево-судинної системи, було виявлено, що за ЦД 1 типу посилюються процеси вільнорадикального окиснення ліпідів, свідченням чого було зростання вмісту ТБК-активних продуктів у тканині серця. При цукровому діабеті вміст ТБК-активних продуктів у тканині серці збільшувався більше ніж у два рази у порівнянні з контролем. При введенні тваринам інгібіторів PARP-1, ІХД та НАМ, спостерігали зниження рівня утворення продуктів пероксидації [157].

Таке підвищення в тканині серця рівня кінцевих продуктів окиснення ліпідів за ЦД може призводити до порушення структурної організації мембран кардіоміоцитів. Ймовірність патологічного характеру змін у таких ліпідозалежних процесах як ліганд-рецепторна взаємодія, сигнальна трансдукція, іонний транспорт також може визначатись ступенем кардіотоксичності прооксидативних ефектів вільних радикалів на ліпідні компоненти біомембран та супроводжується метаболічними перебудовами за умов хронічної гіперглікемії. Нещодавно було встановлено, що деструктивна дія ПОЛ на клітинні структури призводить також до змін фосфоліпідного складу мембран [158]. Отже, підвищення вмісту ТБК-активних продуктів у досліджуваних зразках тканини серця є наслідком інтенсифікації утворення АФК, що призводить до розвитку ОС та, не виключено, недостатньої або зниженої ефективності як ензимної, так і неензимної ланок системи антиоксидантного захисту, що узгоджується з даними літератури [141].

Таким чином, на основі отриманих результатів, можна зробити висновок, про залучення прооксидативного компоненту в опосередкування індукованого гіперглікемією оксидативного стресу в тканинах мозку, лейкоцитах крові та тканині серця свідчить про стійке прогресування ускладнень ЦД. Встановлена нами нормалізуюча дія НАМ на серцево-судинну систему за ЦД 1 типу може реалізуватися завдяки його антиоксидантній здатності, що сприятиме його використанню також в якості важливої складової у терапевтичній схемі лікування серцево-судинних ускладнень.

3.3 Рівень про-/антизапальних цитокінів за умов ЦД 1 типу

В організмі підтримання оптимального рівня глюкози за ЦД може порушуватися не лише при розвитку дисфункцій та втрати здатності β -клітинами продукувати інсулін, але і при підвищенні вмісту прозапальних цитокінів у кровотоці [159]. Цитокіни — це клас невеликих пептидів та протеїнів (8-30 кДа), що регулюють міжклітинні і міжсистемні взаємодії в організмі, включаючи виживання клітин, стимулювання або пригнічення їх росту, диференціювання, функціональну активність та апоптоз, а також забезпечують узгодженість функціонування ендокринної, імунної та нервової систем в нормальних умовах і у відповідь на різні ендо- та екзогенні чинники [160, 161]. У здорових людей вміст цитокінів виявляються лише в слідових кількостях, проте цитокіни виявляють біологічні ефекти навіть в дуже низьких концентраціях. Ці ефекти опосередковані наявністю специфічних високоафінних рецепторів зовні на цитоплазматичній мембрані клітин. Утворення і секреція цитокінів відбувається короткочасно і чітко регулюється. Спектри біологічних активностей цитокінів у значній мірі перекриваються. Це пояснюють тим, що різні цитокін-рецепторні комплекси можуть активувати одні і ті ж протеїни-переносники сигналу [162]. На даний час, їх діагностична значимість полягає в оцінці вмісту про- та антизапальних цитокінів у динаміці розвитку патології, для оцінки тяжкості та прогнозування перебігу захворювання. Наприклад, вміст цитокінів у периферичній крові визначається термінами загострення та відображає динаміку патофізіологічного процесу, зокрема при цукровому діабеті. Однак остаточна роль протизапальних цитокінів у патогенезі ЦД не з'ясована.

При визначенні вмісту ІЛ-4 в сироватці крові щурів нами було виявлено підвищення його вмісту в 1,55 рази (рис. 3.6). 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 (CD₈) при потраплянні інфекції, а також підтипом CD₄-клітин при розвитку запальних процесів [163] за цукрового діабету. Вміст ІЛ-4 та ІФН- γ за експериментального цукрового діабету 1 типу зростає на 52 % та 26 % відповідно (рис. 3.6).

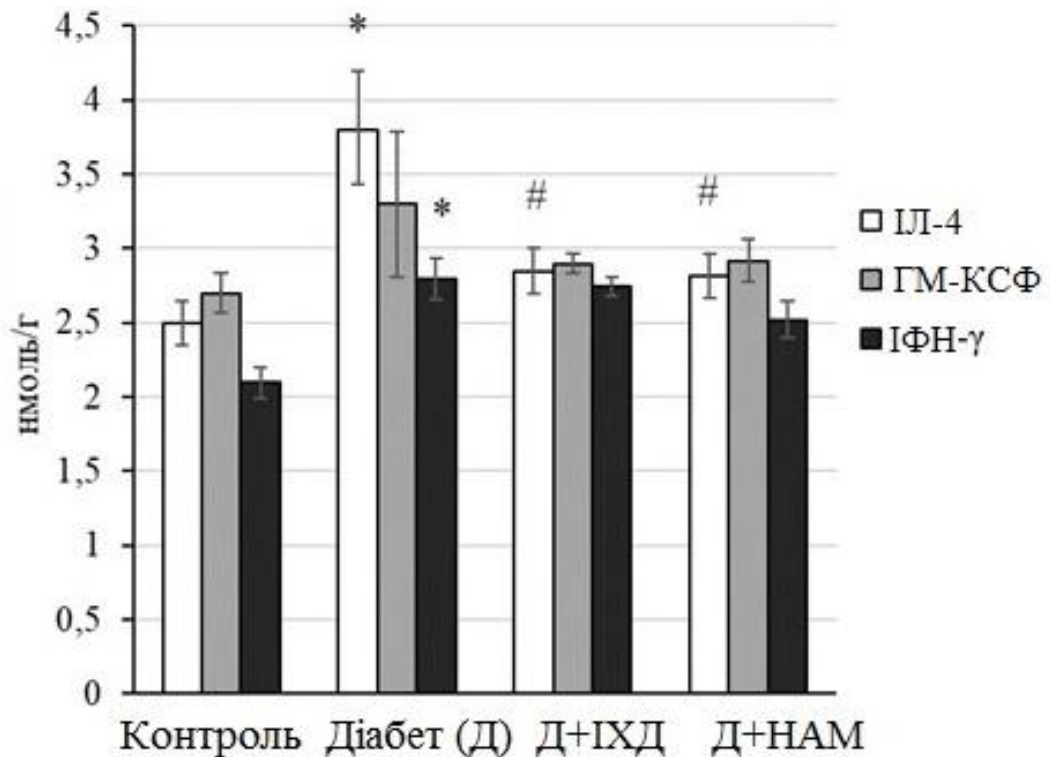


Рис. 3.6. Концентрація інтерлейкіну-4 (ІЛ-4), гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактору (ГМ-КСФ) та гамма-інтерферону (ІФН- γ) в сироватці крові щурів за експериментального ЦД 1 типу та на фоні введення 1,5-ізохіноліндіолу та нікотинаміду. $M \pm m$ ($n = 6$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет»

Разом з тим не було виявлено за ЦД 1 типу 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. Слід зазначити, що у більшості з цих тканин запальні медіатори, такі як ІЛ-1, ІЛ-6, фактор некрозу пухлини альфа (TNF- α) або ендотоксин, є індукторами експресії гена ГМ-КСФ. Біологічні ефекти ГМ-КСФ опосередковані зв'язуванням з рецепторами клітинної поверхні гемопоетичних клітин, а також деяких типів клітин, таких як для прикладу – ендотеліальні.

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. 3.7. Введення ІХД призводило до нормалізації вмісту МХП-1 до рівня контролю, у той час як дія НАМ була менш вираженою.

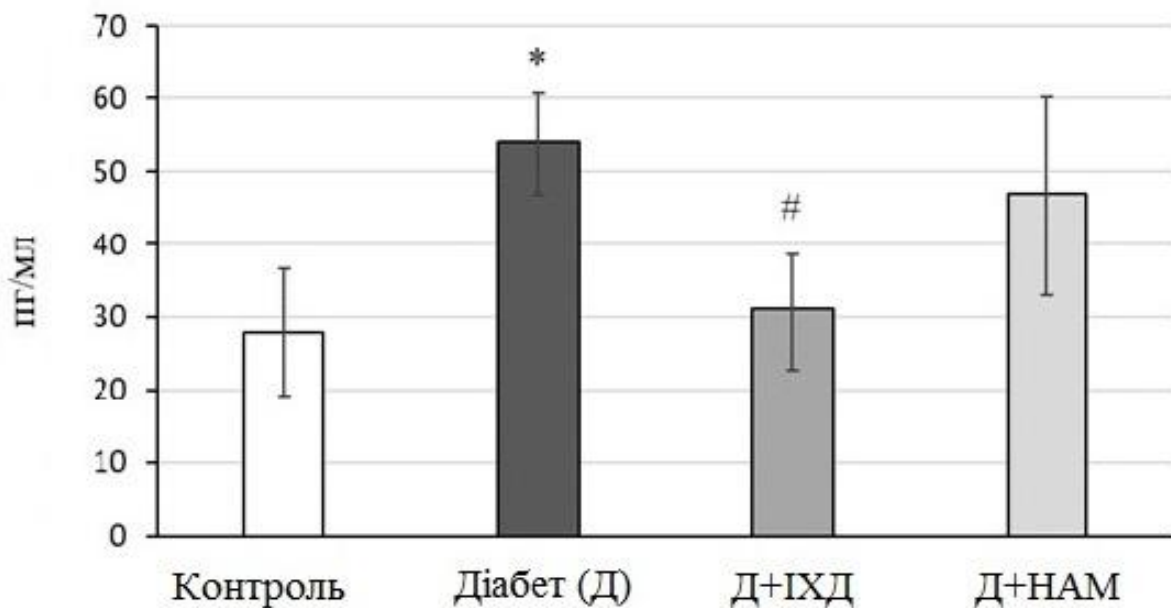


Рис. 3.7. Концентрація моноцитарно-хемотаксичного протеїну-1 (МХП-1) в сироватці крові щурів за експериментального ЦД 1 типу та на фоні введення 1,5-ізохіноліндіолу та нікотинаміду. $M \pm m$ ($n = 6$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет»

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 імунокомпетентних клітин.

Разом з даними, що стосуються оксидативного стресу та запалення до чинників які можуть призвести до діабету, дослідження, проведені на різних експериментальних моделях клітин і тварин, дозволяють припустити, що активація транскрипційного фактору NF κ B є однією із ключових подій на початкових етапах розвитку ЦД 1 типу та його ускладнень. Як відомо, родина ядерних факторів NF κ B налічує 5 протеїнів, які можуть утворювати в різних комбінаціях гомо- та гетеродимери. Кілька досліджень підкреслювали активацію NF κ B за гіперглікемії та зв'язок з діабетичними ускладненнями. Дослідження на різних експериментальних моделях показують взаємозв'язок між дисфункцією нейронів та активацією NF κ B і експресією прозапальних цитокінів [214], а також те, що нейрональний апоптоз, який пов'язаний з активацією NF κ B, може відігравати ключову роль у порушенні нейронів, когнітивних функцій [215]. NF κ B є важливим транскрипційним фактором, який приймає участь в реалізації багатьох клітинних процесів, в тому числі репарації ДНК та імунної відповіді [226]. Існують дані, що відбувається інгібування NF- κ B шляху нікотинамідом за хвороби Альцгеймера [216].

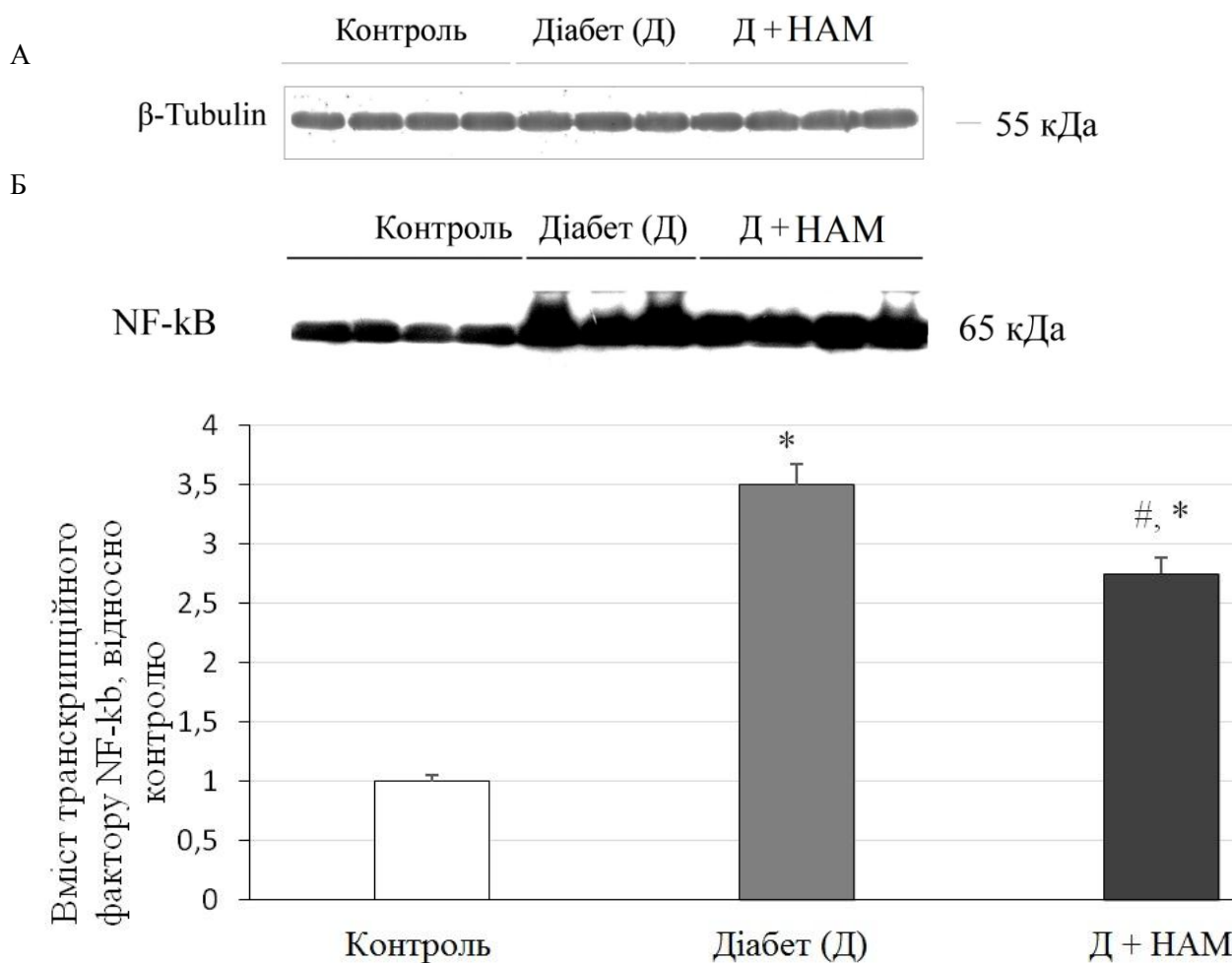


Рис. 3.8. Результати вестерн-блот аналізу: А. Типові блотограми транскрипційного фактору NF-κB у тканині головного мозку щурів за експериментального ЦД 1 типу та на фоні введення та нікотинаміду; Б. Результати денситометрії, що відображають відносний вміст транскрипційного фактору NF-κB, $M \pm m$ ($n = 6$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет»

Тому доцільно було оцінити рівень експресії транскрипційного фактору NF-κB. За даними Вестерн-блот-аналізу експресія NF-κB збільшувалася в 3,5 рази у головному мозку діабетичних щурів у порівнянні з контрольною групою (рис. 3.8). При введенні НАМ діабетичним щурам рівень експресії NF-κB знижувався в 1,3 рази. Отримані нами дані узгоджуються з результатами інших досліджень, які встановили, що в

гіпокампі діабетичних щурів спостерігається не тільки надпродукція АФК, але також спостерігається стійка активація NFκB [217].

Існують переконливі докази функціонального зв'язку між ядерним фактором NFκB та PARP-1, що пояснюють залучення ензиму в реалізації імунної відповіді [227]. Результати досліджень, що ґрунтуються на використанні інгібіторів PARP-1, є свідченням залучення даного ензиму в реалізації імунної відповіді. Як відомо, активація процесу полі-АДФ-рибозилування протеїнів в макрофагах та моноцитах може призводити до посилення експресії генів індукцибельної NO-синтази (iNOS), інтерлейкіну-6 (ІЛ-6) та фактора некрозу пухлин α (TNF-α) [228]. Було показано також, що важливою складовою механізму розвитку запальних процесів є вплив PARP-1 на біосинтез простагландинів через транскрипційну регуляцію експресії циклооксигенази-2 [229]. PARP-1 відіграє важливу роль у підтриманні балансу між протизапальними/регуляторними та прозапальними/ефекторними відповідями. Згідно літературних даних було показано, що пригнічення ензиматичної активності PARP-1 знижує секрецію прозапальних цитокінів та нормалізує стан організму при деяких експериментальних автоімунних захворюваннях. При чому інгібування PARP-1 впливає на диференціацію Т-клітин, сприяючи перетворенню простих Т-клітин CD4⁺ у регуляторні Т-клітини [230].

Розділ 4. Перебіг процесів полі-АДФ-рибозилування у тканинах головного мозку діабетичних щурів за введення ІХД або НАМ

Вважається, що найбільш безпосередніми причинами розвитку та прогресування діабетичної нейропатії (ДН) є тривала гіперглікемія та порушення ряду метаболічних процесів, пов'язаних із цим ускладненням діабету. Зокрема, це інтенсифікація оксидативно-нітрозативного стресу, накопичення кінцевих продуктів глікозилювання, істотні зміни у вуглеводному та ліпідному обміні тощо [164].

Основним і найбільш руйнівним ускладненням діабету є периферична ДН, але за її розвитку також виникають сутєві зміни у функціонуванні ЦНС, які супроводжуються розвитком низки дисфункцій головного мозку. Тобто ці порушення не тільки фізіологічному, але і на метаболічному та структурному рівні пов'язані з ДН, проявляються навіть на молекулярному рівнях, і ці патологічні порушення є тривалими. Така ситуація яка неминуче призводить до функціональних і структурних змін у мозку, які відповідають за формування пам'яті, розумових здібностей та емоційну поведінку, в свою чергу змінами функцій всього організму, що призводить до значних негативних соціальних наслідків.

В даний час запропоновано відносно широкий спектр фармакологічних препаратів для симптоматичного лікування периферичних ДН та енцефалопатій [165]. Ряд нових препаратів, включаючи ацетил-L-карнітин, альфа-ліпоєву кислоту, інгібітори протеїнкінази С (наприклад, рубоксистаурин), інгібітори альдозоредуктази (фідарестат), засоби, що впливають на накопичення кінцевих продуктів (аміногуанідин), які впливають на гексозаміновий шлях (бенфотіамін), інгібітори ангіотензин-перетворюючого ферменту (трандолаприл), а також інгібітори полі (АДФ-рибози) полімерази, PARP-1 (нікотинамід, НАМ), досліджуються та використовуються у клінічній практиці. Більшість цих препаратів можуть діяти одночасно за допомогою декількох механізмів. Зокрема, НАМ має

досить широкий спектр дії, впливає на нейромедіаторні системи, зокрема на серотонінергічну систему, а також на функціонування натрій-калієвої помпи. Ми встановили його коригуючу дію в мозку щурів в умовах розвитку ЦД 1-го типу [166]. Зрозуміло, що вибір найбільш ефективного препарату для лікування конкретного типу ДН (енцефалопатія, вегетативна нейропатія або периферична нейропатія) неможливий без ідентифікації всіх можливих механізмів дії інгібіторів PARP-1. Це стимулювало пошук нових ефективних препаратів цільової дії. Крім того, з'ясування впливу інгібіторів PARP-1 на розвиток ДН також важливе для глибшого розуміння не тільки механізмів дії цих препаратів, але й конкретних механізмів, що лежать в основі розвитку ДН, які залишаються недостатньо вивченими. Як відомо, хронічна гіперглікемія супроводжується значними фізіологічними, біохімічними та гістологічними змінами у пацієнтів, які страждають на ЦД. Такі зміни неминуче призводять до розвитку ендотеліальних дисфункцій. Це, у свою чергу, спричиняє зниження інтенсивності кровотоку та розвиток внутрішньонейронної та внутрішньоклітинної гіпоксії. Стан генералізованої гіпоксії посилює розвиток патофізіологічних та морфологічних змін у клітинах мозку за умов ДН [167]. У такій ситуації розвиваються кардинальні зміни в ендотелії судин, які забезпечують кровопостачання нервів. У цьому випадку починають залучатися інші важливі молекулярні механізми; зокрема, це стрес ендоплазматичного ретикулума, посилене фосфорилування мітоген активованих протеїнкіназ (МАРК) [168], активація PARP-1 та активація кількох інших ферментів [169]. За цих умов можуть також розвиватися запальні процеси, які провокують тканини швидко реагувати на відповідні зміни. Це призводить до супутньої участі різних типів клітин, при яких регуляція експресії певних генів може бути порушена через дію різних негативних факторів.

Відомі експериментальні дані вказують на те, що зростання інтенсифікації АДФ-рибозилування протеїнів може відігравати ключову роль у розвитку цукрового діабету та його ускладнень, а моделювання даного

процесу може бути новим підходом у підходах до створення протоколів лікування ускладнень діабету [170, 171]. Тим не менш, питання щодо взаємозв'язку між дисфункціями головного мозку на фоні ЦД та змінами в процесах полі-АДФ-рибозилування протеїнів все ще залишається відкритим. Відомо, що ЦД 1 типу у щурів супроводжується ОС у тканинах головного мозку та викликає активацію полі-АДФ-рибозилування ядерних протеїнів у відповідь на пошкодження ДНК [103]. Ці дослідження нами продовжені на молекулярному рівні з метою з'ясувати, чи відбуваються зміни експресії PARP-1. Більше того, доцільним було оцінити чи існує зв'язок активації процесів полі- АДФ-рибозилування протеїнів у мозку тварин із іншими НАД-залежними процесами.

Представлені на рис. 4.1 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. Разом з тим 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. 4.2).

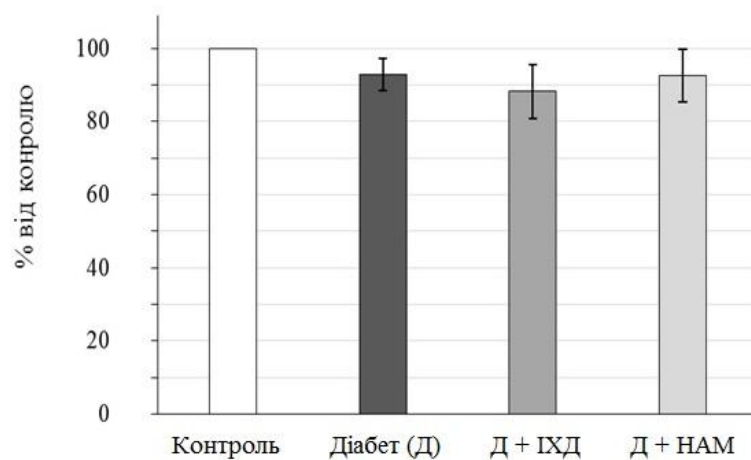


Рис. 4.1. Експресія мРНК гену *Parp-1* в мозку щурів за умов ЦД 1 типу, % від контролю

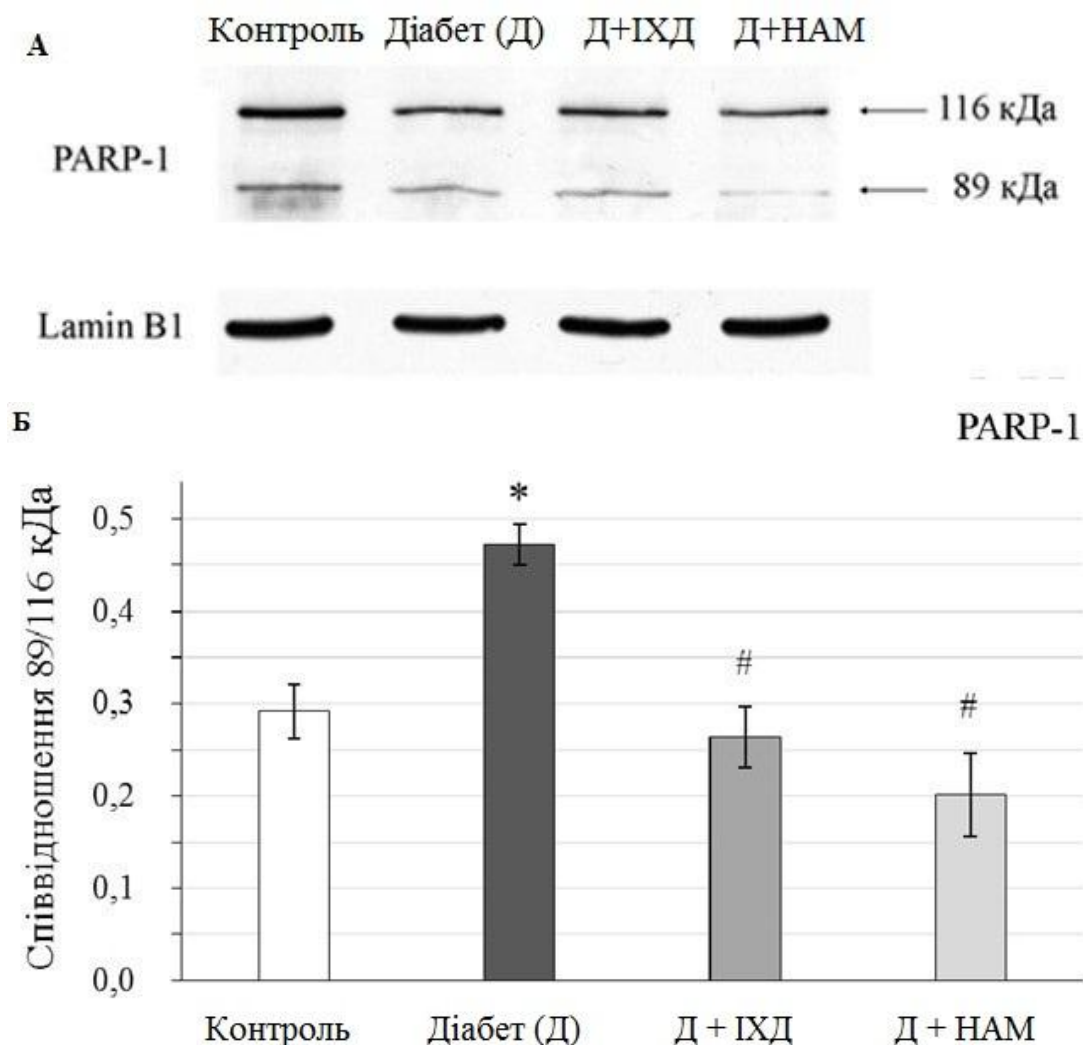


Рис. 4.2. Результати вестерн-блот аналізу: А. Типові блотограми фрагменту 89 кДа та цілої молекули PARP-1 116 кДа в ядерній фракції головного мозку щурів за експериментального ЦД 1 типу та на фоні введення 1,5-ізохіноліндіолу та нікотинаміду; Б. Результати денситометрії, що відображають співвідношення фрагменту 89 кДа та цілої молекули PARP-1 116 кДа, $M \pm m$ ($n = 6$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет»

Підвищений вміст 89 кДа фрагменту PARP-1 зумовлений надактивацією даного ензиму та збільшенням вмісту полі-АДФ-рибозильованих протеїнів (PAR) у головному мозку. Дійсно фрагментація PARP-1 супроводжується збільшенням вмісту рибозильованих протеїнів в екстрактах тканини мозку, про що свідчать дані представлені на рис. 4.3. Такі зміни можуть бути

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

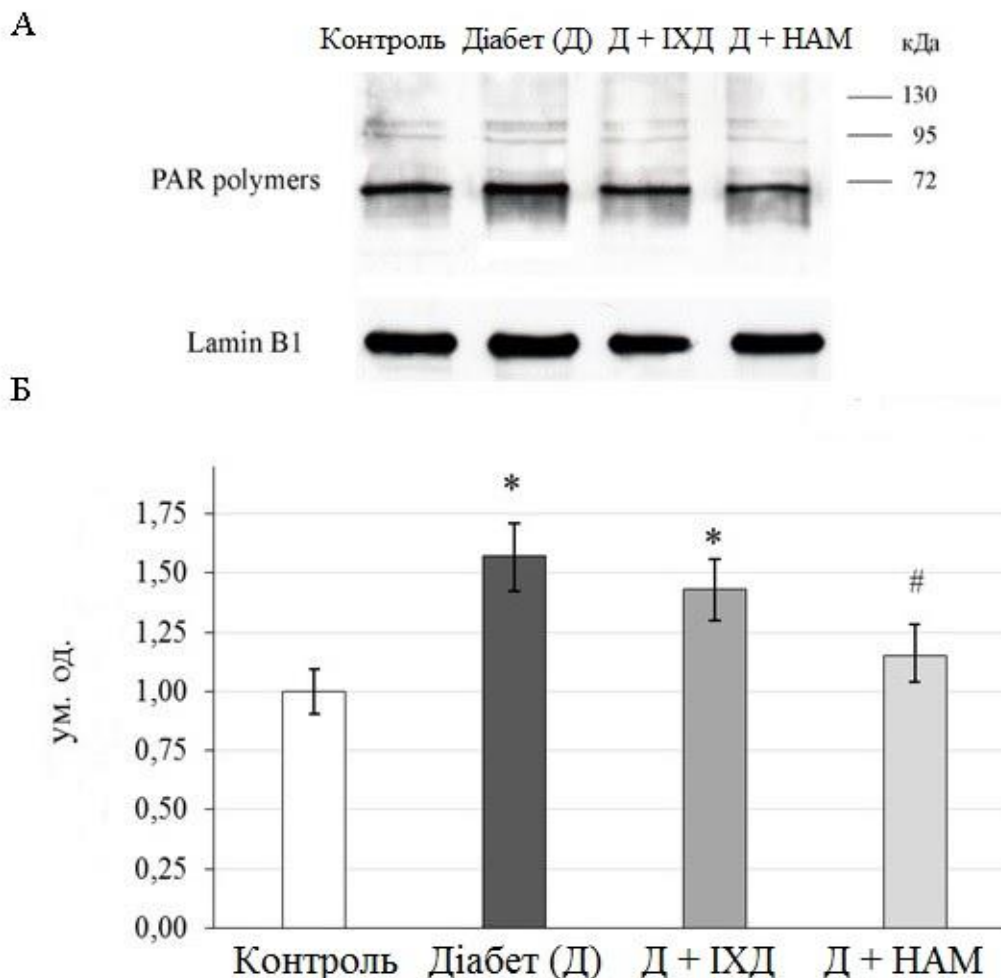


Рис. 4.3. Результати вестерн-блот аналізу полі-АДФ-рибозильованих протеїнів в ядерному екстракті тканини головного мозку щурів за експериментального ЦД 1 типу та на фоні введення 1,5-ізохіноліндіолу та нікотинаміду: А. Типові блотограми; Б. Результати денситометрії, що відображають відносний вміст полі-АДФ-рибозильованих протеїнів; $M \pm m$ ($n = 6$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет»

Отримані дані корелюють із активністю PARP-1 в ядерній фракції головного мозку, яку оцінювали за кількістю 8-¹⁴C-НАД⁺, включеного до загальних ядерних протеїнів клітин головного мозку щурів (рис. 4.4). За

введення діабетичним щурам інгібіторів PARP-1 спостерігали зниження активності ензиму за їх впливу (рис. 4.4).

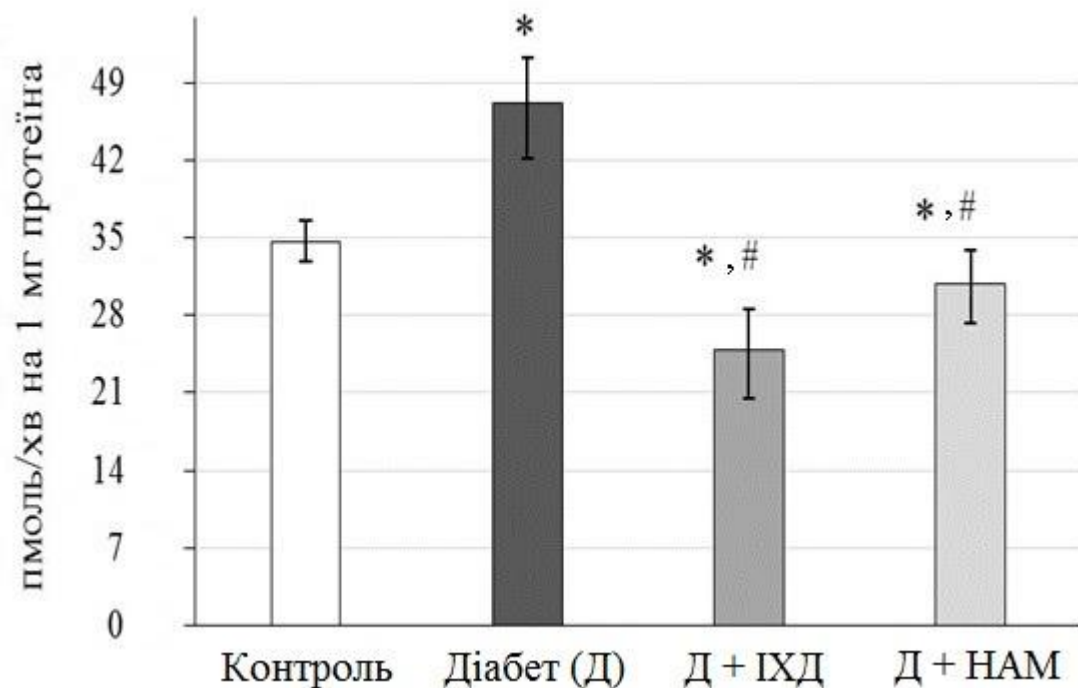


Рис. 4.4. Активність ензиму PARP-1 в ядрах головного мозку щурів за експериментального ЦД 1 типу та на фоні введення 1,5-ізохіноліндіолу та нікотинаміду, $M \pm m$ ($n = 6$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет»

На даний час значна увага приділена дослідженню НАД-залежних деацетилаз сіртуїнів (СІРТ). СІРТ-протеїни (Silent Information Regulators) є спеціальні протеїни, які належать до III класу деацетилаз гістонів і забезпечують сайленсинг генів для регуляції специфічних функцій тієї чи іншої тканини. Вони залучені до багатьох клітинних процесів та відіграють ключову роль у розвитку запалення та регуляції обміну речовин. За розвитку ЦД 1 типу 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. 4.5). Вважають, що зростання активності СІРТ1 може призводити до продовження життя за рахунок його позитивного впливу на метаболічні процеси [172]. 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.

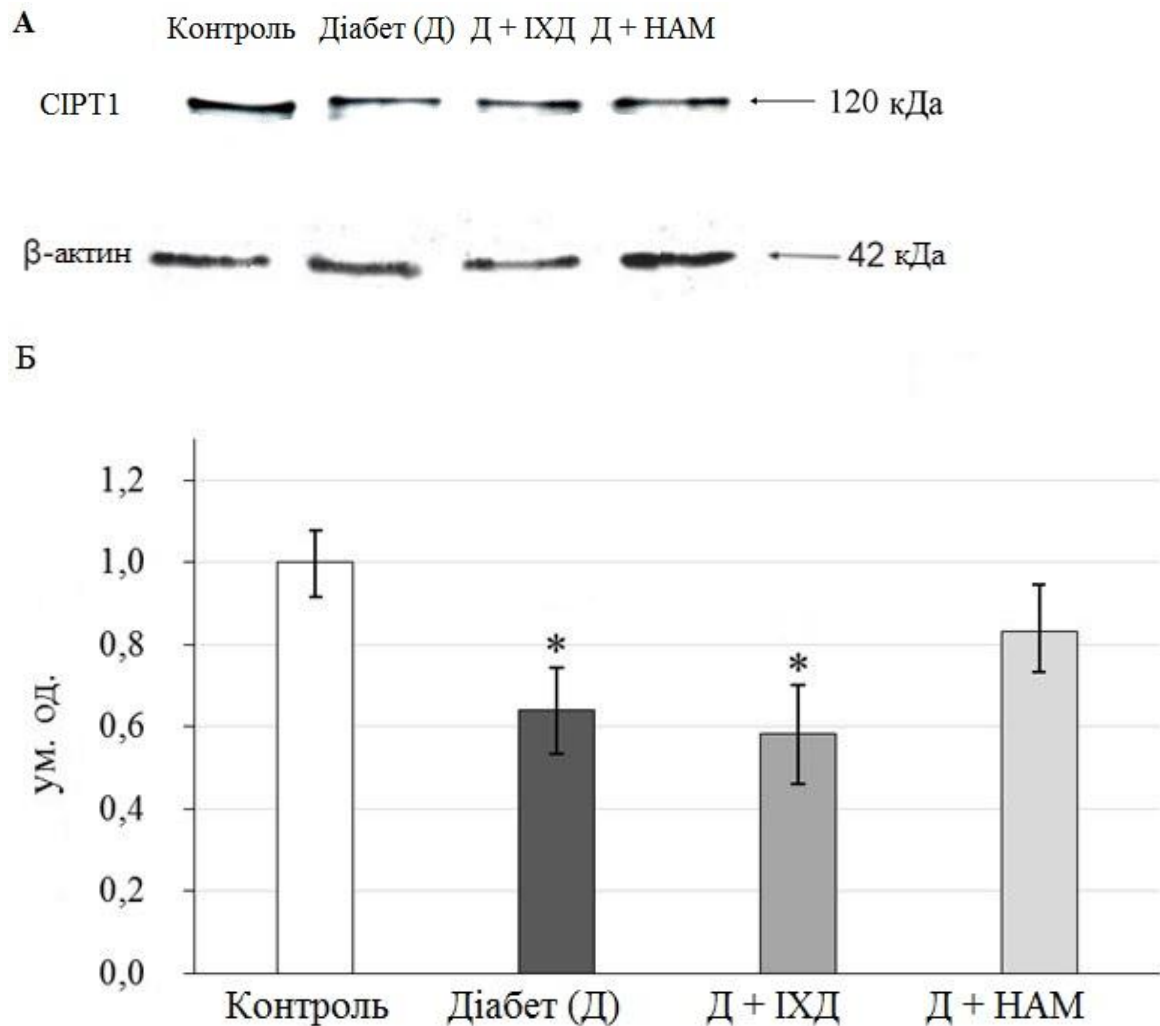


Рис. 4.5. Результати вестерн-блот аналізу: А. Типові блотограми деацетилази СІРТ1 за експериментального ЦД 1 типу та на фоні введення 1,5-ізохіноліндіолу та нікотинаміду; Б. Результати денситометрії, що відображають відносний вміст деацетилази СІРТ1 в ядерному екстракті тканини головного мозку щурів; $M \pm m$ ($n = 6$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»

Оскільки PARP-1, а також SIRT1 є НАД⁺-залежними ензимами, то цілком імовірно, що вони можуть конкурувати за доступність вільного НАД⁺, тим самим призводити до зниження його вмісту у клітинах, що має важливе функціональне значення. Так було показано на ембріональних фібробластах, дефіцитних за SIRT1 мишей, що відбувалася посилена активація PARP-1 у відповідь на пошкодження ДНК та клітинну загибель через вивільнення мітохондріального проапоптичного протеїну [231]. Аналогічно за дії ресвератролу відмічалась підвищення гістон-деацетилюючої активності SIRT1, що в свою чергу знижувало активність PARP-1 [232]. Результати дослідження узгоджуються з уже відомими фактами про те, що надмірне використання НАД⁺ у процесі репарації ДНК, разом з інгібуванням деацетилазної активності SIRT1, сприяє покращенню доступності хроматину. Окрім того, ключова роль SIRT1 у НАД⁺-залежному деацетилюванні протеїнів передбачає його функціонування як сенсора енергетичного стану клітин, який об'єднує транскрипційну регуляцією з енергетичним метаболізмом [233]. Обіг внутрішньоклітинного пулу НАД⁺ має важливе значення не тільки у перебігу окисно-відновного обміну, але й для підтримки НАД⁺-залежних патологічних сигналів. НАД⁺ є субстратом АДФ-рибозилтрансферази, що каталізує реакції переносу АДФ-рибози, що розщеплює НАД⁺ до нікотинамідних та АДФ-рибозильних продуктів, які відіграють ключову роль у клітинних сигнальних каскадах, що регулюють експресію генів, прогресування клітинного циклу, секрецію інсуліну, ДНК відновлення, апоптоз та старіння [234].

Згідно з літературними даними інгібування PARP-1 та NFκB нікотинамідом, а також зростання внутрішньоклітинного пулу НАД⁺ та збільшення експресії SIRT1 полегшує протікання запалених процесів, оксидативного стресу, фіброзу та апоптозу ниркових клітин, які є ключовими етіологічними проблемами захворювання нирок [235].

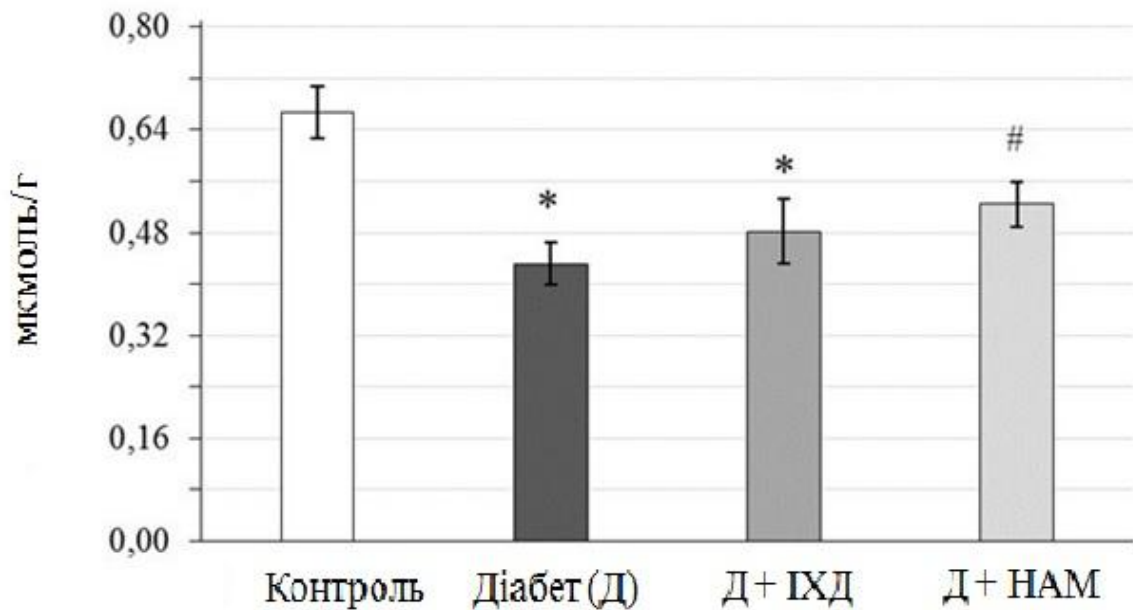


Рис. 4.6. Концентрація НАД⁺ в головному мозку щурів за експериментального ЦД 1 типу та на фоні введення нікотинаміду та 1,5-ізохіноліндіолу, $M \pm m$ ($n = 6$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет».

Дійсно, було встановлено, що за ЦД 1 типу на тлі зниженого вмісту НАД⁺, який частково нормалізувався (рис. 4.6), відбуваються зміни рівноваги концентрацій НАД⁺/НАДН у головному мозку діабетичних щурів у сторону зменшення їх співвідношення до рівня 72,5 порівняно із 183,8 у контролі (рис. 4.7). При цьому введення ІХД або НАМ підвищувало співвідношення вільних НАД⁺/НАДН пар в мозку щурів за ЦД 1 типу до рівня та 91,5 та 127,5 що свідчить про те що у випадку НАМ спостерігали тенденцію до нормалізації даного показника.

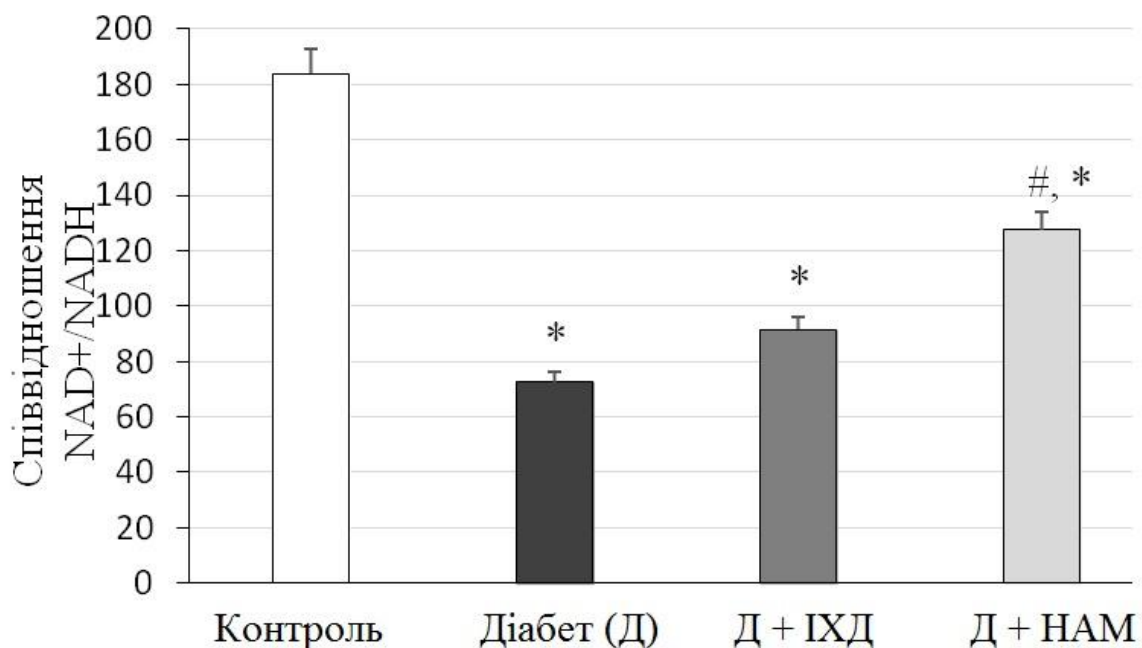


Рис. 4.7. Співвідношення вільних НАД⁺/НАДН пар в мозку щурів за експериментального ЦД 1 типу та на фоні введення 1,5-ізохіноліндіолу та нікотинаміду, $M \pm m$ ($n = 6$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет».

Аналогічні зміни у тканині мозку щурів були також виявлені нами на моделі експериментального цукрового діабету 2 типу, а саме співвідношення НАД⁺/НАДН становило 122 ± 18 за діабету у порівнянні із 212 ± 22 у контролі.

Розділ 5. Ефект інгібіторів PARP-1 на обмінні процеси в великогомілкових та малогомілкових кістках щурів за ЦД 1 типу

На даний час невпинно продовжується пошук нових препаратів, використання яких повинно сприяти ефективному запобіганню розвитку та прогресуванню діабетичної нейропатії у пацієнтів із цукровим діабетом як 1 типу, так і діабетом 2 типу. Тому необхідні нові підходи до пошуку препаратів, особливо природнього походження, які не володіють побічними наслідками, а також професійні зусилля, що забезпечать ефективну профілактику та лікування цього ускладнення діабету. Разом із тим, не дивлячись на те, що розуміння надзвичайної складності механізмів залучених до розвитку та перебігу діабетичної нейропатії суттєво розвинулось за останнє десятиліття, все ж таки повністю механізми, які лежать в основі нейропатії за діабету 1 та 2 типу, залишаються невідомими, що є завданням науковців в цій галузі та потребує вирішення всіх аспектів діабетичної нейропатії - від профілактики до лікування.

У хворих на ЦД можуть розвиватися різні патологічні ускладнення, зокрема одного із найбільш поширеніших, діабетичної невропатії (ДН) [218]. Передумовою виникнення якої є окислювальний стрес внаслідок тривалої гіперглікемії, зміни функціонування ключових метаболічних процесів в ЦНС, які в свою чергу призводять до втрати нервових клітин та розвитку когнітивних, поведінкових та психічних порушень, втратою чутливості та больовими відчуттями в кінцівках [219]. Як відомо до розвитку ускладнень ЦД призводить також надмірна активація поліолового шляху обміну глюкози, а саме його ключового ензиму альдозоредуктази. В результаті чого відбувається накопичення сорбітолу в нервових закінченнях, що супроводжується осмотичними порушеннями, змінами у структурі, фрагментацією нервових, частковою їх демієлінізацією, набряком та зменшенням нервових волокон.

Акумуляція сорбітолу у тканинах, що є наслідком дуже повільного його обміну в усіх тканинах, за винятком печінки, а також поєднання з постійною гіперглікемією може призвести до загибелі клітин [220]. Результати попередніх досліджень в нашій групі показують збільшення вмісту сорбітолу в сідничному нерві діабетичних щурів в 10,44 рази порівняно з контрольною групою [221].

Зміни за діабетичної нейропатії в периферичній нервовій системі та сполучній тканині також могли призводити до змін у синтезі та структурі колагену, основного протеїну кісток [173]. Не можна виключити, що зміни на рівні амінокислот, які входять до складу колагену кісток можуть сприяти розвитку ускладнень діабету. Діабет на пізніх стадіях розвитку викликає структурні та функціональні зміни протеїнів позаклітинного матриксу в багатьох тканинах та клітинах [174]. Зміни у сполучній тканині, пов'язані з діабетом, такі як остеопенія та зниження міцності кісток, можуть бути пов'язані у першу чергу зі змінами метаболізму колагену типу I [175]. Більш того, втрата маси кісткової тканини з настанням менопаузи з поступовим руйнуванням будови трабекулярної кістки є основним детермінантом ризику перелому і розвитку остеопорозу [176]. Лікування переломів кісток у хворих на ЦД, особливо довгих кісток або великих суглобів, часто не є успішним.

Колаген типу I, як основний білковий компонент кісток, становить більше 90 % сухої маси кістки, і піддається постійному синтезу і деградації у відповідь на механічний вплив. Показано, що синтез колагену контролюється інсуліном на посттранскрипційному рівні [177]. Інші автори встановили, що ген колагену $\alpha 2 (I)$ містить два функціональні промотори, і його експресія в клітинах регулюється як на транскрипційному, так і на посттрансляційному рівнях [178]. Передбачається, що зміни в амінокислотному складі колагену типу I в результаті поліморфізму гена можуть сильно впливати на властивості білка і його фізіологічні функції.

Відомо, що колаген переважно містить амінокислоти гліцину, проліну, аланіну та гідроксипроліну, що накладає унікальні обмеження на будову його

спіралі. Звичайно амінокислотна послідовність колагену містить повторювані три пептидні фрагменти в якій лише залишки гліцину можуть розміститися в дуже щільному місці з'єднання окремих альфа-ланцюгів, що унеможливило його заміну жодною іншою амінокислотою без значного пошкодження структури колагену. Наявність залишків проліну та гідроксипроліну спричиняє різкі перегини колагенової спіралі. Послідовність амінокислот і над скручена четвертинна структура колагену дають можливість щільно упаковувати три основні поліпептиди. Альфа-ланцюги колагенових молекул і колагенові молекули фібрил поперечно з'єднуються за допомогою ковалентних зв'язків особливих типів, що містять залишки лізину та гідроксилізину чи похідні гістидину. Ці зв'язки утворюють залишки нестандартних амінокислот, таких як дегідрогідроксилізонорлейцин. Накопичення у колагенових фібрилах таких ковалентних зв'язків є причиною збільшення жорсткості та крихкості сполучної тканини людини з віком.

При оцінці амінокислотного складу колагену типу I у великогомільковій та малогомільковій кістках було виявлено значні відмінності між групами контролю та діабету.

Нами було виявлено значні відмінності, в амінокислотному складі колагену типу I, між містками контрольних та діабетичних тварин. Вміст гідроксипроліну в колагені I типу великогомількових та малогомількових 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. 5.1). Зміни, пов'язані з ЦД в амінокислотному складі колагену типу I, головним чином впливали на ті амінокислоти, які як відомо, беруть участь у формуванні спіралі, поперечних зв'язок і заряду молекул. Зміни амінокислотного складу колагену кісток щурів з індукованим ЦД I типу були істотними порівняно з контролем (табл. 5.1). Статистично значущі зміни зареєстровані в амінокислотному складі 17 амінокислот.

Табл. 5.1. Амінокислотний склад колагену типу I виділеного з великогомілкової та малоогомілкової кісток щурів (n = 6).

Амінокислота	Контроль	Діабет (Д)	Д + НАМ
Гідроксилізин	7±0,6	4±0,3*	5±0,4 [#]
Лізин	39±3,1	58±4,6*	49±1,8*, [#]
Гістидин	5±0,4	11±0,8*	8±0,5 [#]
Аргінін	48±3,4	70±5,6*	56±3,3*
Аспарагінова кислота	39±2,2	116±7,8*	96±6,7*, [#]
Треонін	24±1,9	37±2,7*	30±2,5*, [#]
Серин	38±1,9	52±2,8*	43±2,7 [#]
Глутамінова кислота	98±7,8	135±7,1*	134±7,4*
Пролін	102±8,1	70±4,7*	92±5,2 [#]
Гліцин	304±19,5	164±9,5*	181±7,8*, [#]
Аланін	109±7,8	81±5,3*	90±5,9*, [#]
Валін	23±1,7	28±1,5*	22±1,3 [#]
Метіонін	6±0,5	14±0,8*	13±0,7*
Ізолейцин	14±1,1	23±1,2*	22±1,3*
Лейцин	28±2,1	63±4,4*	64±4,8*
Тирозин	5±0,4	10±0,7*	8±0,6*
Фенілаланін	12±0,8	37±2,6*	34±2,1*

Кожне значення являє собою середнє значення на 1000 амінокислотних залишків. * P<0,05 порівняно з групою «Контроль»; # P<0,05 порівняно з групою «Діабет»

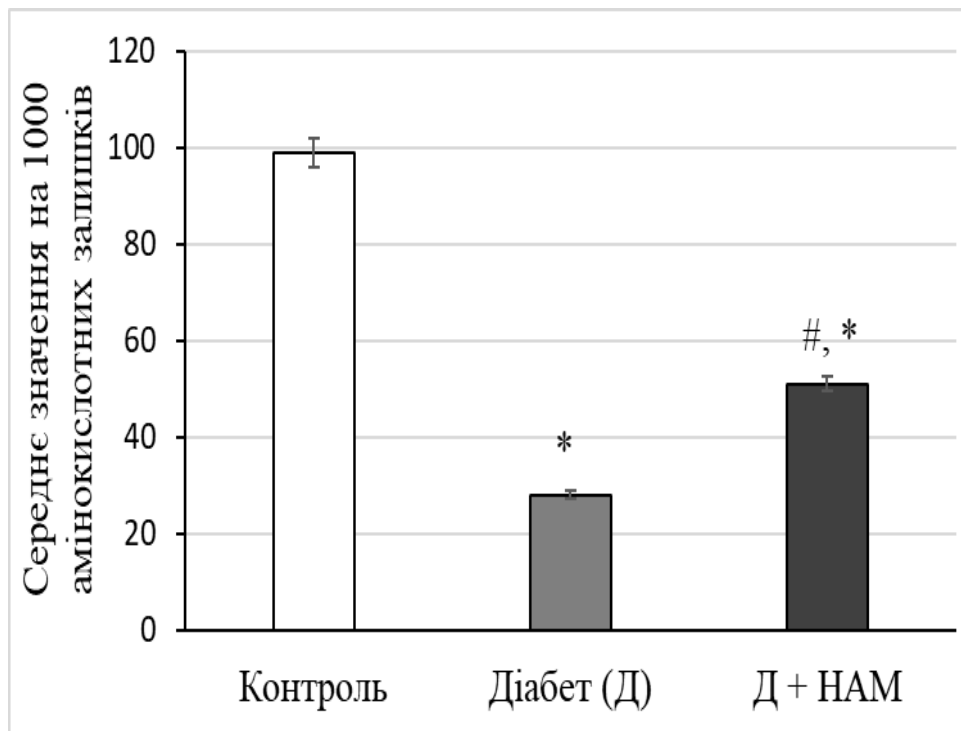


Рис. 5.1. Вміст гідроксипроліну в колагені типу I виділеного з великогомілкової та малоогомілкової кісток щурів за експериментального ЦД 1 типу та на фоні введення нікотинаміду ($n = 6$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет».

У великогомілкових та малоогомілкових кістках щурів за ЦД 1 типу, колаген типу I містить зниження вмісту гідроксилізіну на 44 %, гідроксипроліну на 73 %, проліну на 33 %, гліцину на 47 % та аланіну на 23 %, тобто зниження вмісту саме тих амінокислот, які мають безпосередній вплив на структуру спіралі, жорсткість і поперечні зв'язки колагену [179]. Залишки гідроксилізіну разом з лізином і гістидином також залучені у поперечному зв'язуванні та формуванні молекули колагену.

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 (молярного

співвідношення амінокислот з розгалуженим ланцюгом до ароматичних амінокислот (Лей + Іле + Вал / Тир + Фен) знижується до 63,6 % відносно контролю (рис. 5.2). Не дивлячись на те, що введення НАМ призводило до часткового відновлення вмісту ряду амінокислот в колагені, а також його вмісту в кістках щурів, НАМ має частковий нормалізуючий ефект на співвідношення Фішера. Нормалізуюча дія НАМ стосувалася тієї кількості амінокислотних залишків, які могли б впливати на поверхневий заряд молекули колагену: аспарагінова кислота, треонін і серин. Незважаючи на часткову нормалізацію вмісту залишків проліну, його рівень залишався нижчим, ніж у контролі.

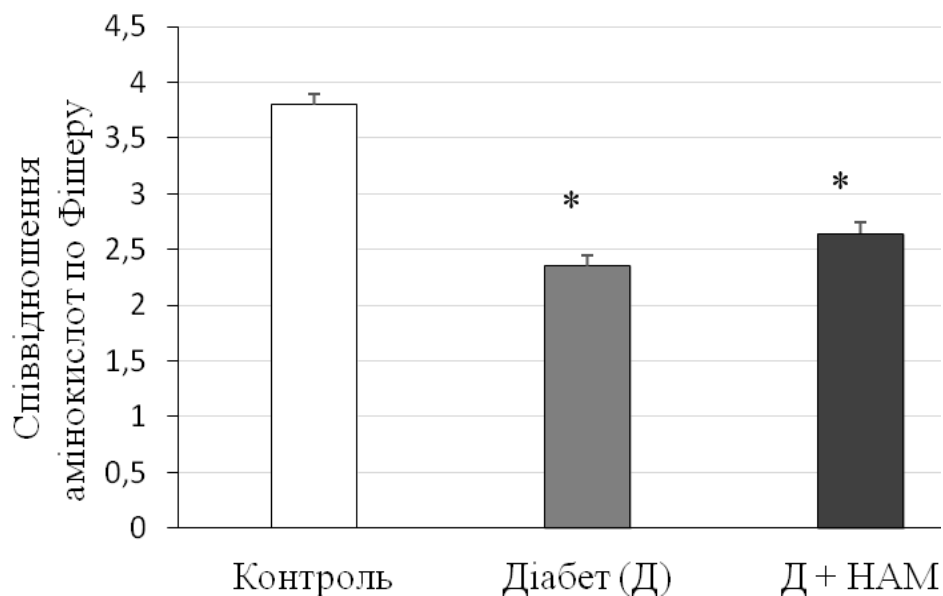


Рис. 5.2. Співвідношення амінокислот по Фішеру (Лей + Іле + Вал / Тир + Фен) у кістках щурів за експериментального ЦД 1 типу та на фоні введення та нікотинаміду (n = 6). *P<0,05 порівняно з групою «Контроль»;

Літературні дані вказують на те, що вітаміни С і Е беруть участь у біосинтезі колагену. Добре відомо, що L-аскорбінова кислота відіграє ключову роль як кофактор у посттрансляційній модифікації молекул колагену і в біосинтезі колагену, карнітину і нейротрансмітерів [180]. Вітамін Е (α -токоферол) може пригнічувати резорбцію кісток, одночасно

стимулюючи формування кісткової тканини *in vivo* у похилому віці [181]. Крім того, вітамін Е має позитивну тенденцію до регенерації кісткової тканини [182]. Проте існують суперечливі дані щодо ролі α -токоферолу в синтезі колагену, що свідчить як про його інгібуючу, так і про стимулюючу дію.

Зростаюча кількість доказів показала, що вітамін В₃ (нікотинамід, нікотинова кислота) має важливу фізіологічну та фармакологічну дію. Цей вітамін все ще залишається найбільш ефективним препаратом з точки зору його здатності впливати на багато метаболічних процесів. Раніше продемонстровано, що вітамін В₃ покращує життєздатність бета-клітин у різних моделях тварин, включаючи стрептозотоцин, радикали кисню, та оксид азоту, та індукує диференціювання ембріональних стовбурових клітин які секретують інсулін тощо [183, 184].

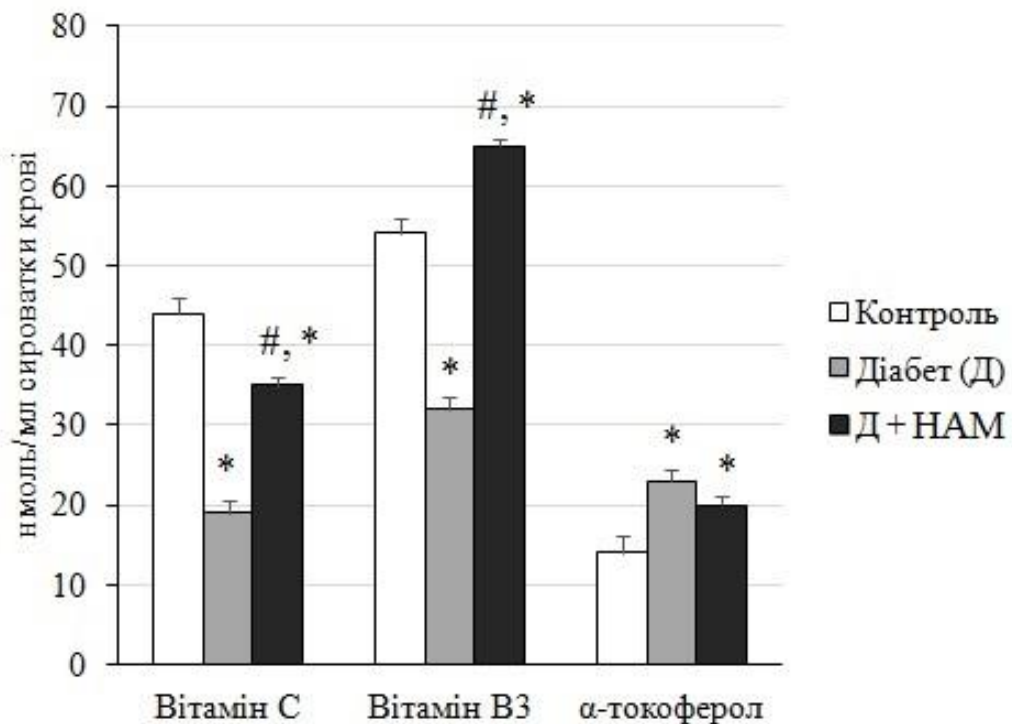


Рис. 5.3. Вміст вітаміну С, В₃ та α -токоферолу в сироватці крові щурів за експериментального ЦД 1 типу та на фоні введення нікотинаміду, $M \pm m$ ($n = 6$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет».

Вміст вітамінів С і В₃ значно знижувався як у сироватці крові (рис. 5.3), так і в печінці (рис. 5.4) при ЦД, а рівень α -токоферолу, найбільш поширеного і активного акцептору пероксильних радикалів, був збільшений. (Рис. 5.3 і 5.4). Знижений вміст вітамінів може бути пов'язаним з їх підвищеним споживанням за рахунок зростання оксидативного стресу, виявленого в різних тканинах у діабетичних щурів, а також через зменшення НАДФН-залежної регенерації вітаміну С, оскільки його рівень мав тенденцію до нормалізації після лікування НАМ (рис. 5.3 і 5.4). Відновлення вмісту вітаміну В₃ у кровообігу та печінці і незначне зниження рівня α -токоферолу спостерігалися в результаті введення НАМ.

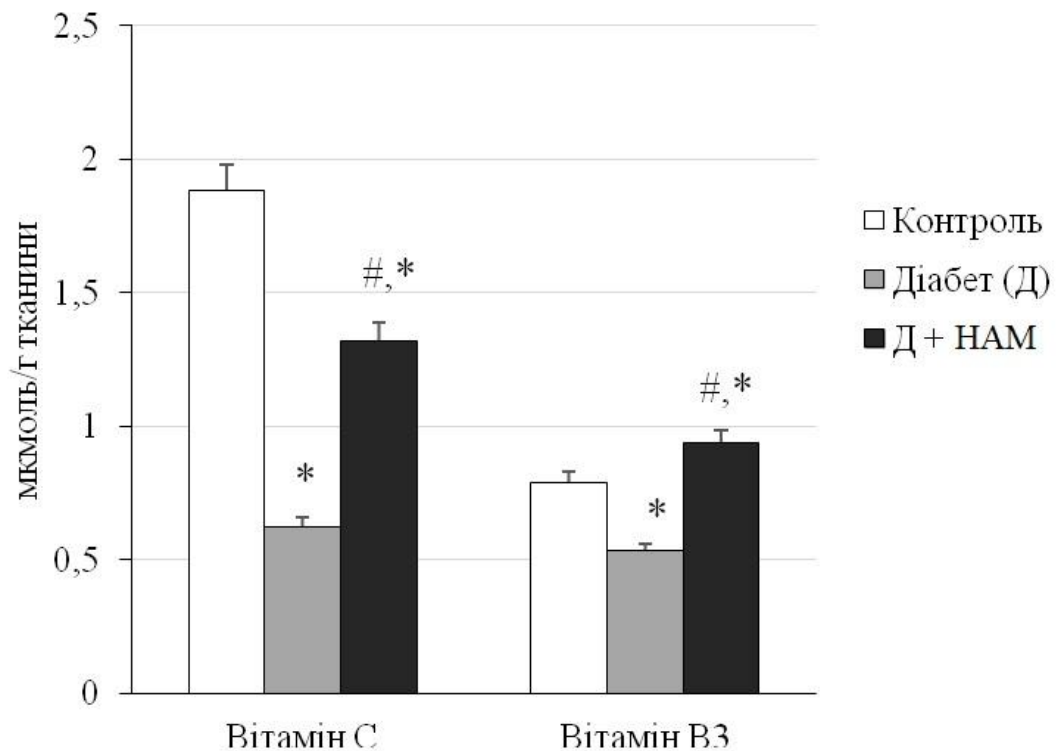


Рис. 5.4. Вміст вітаміну С та В₃ в печінці щурів за експериментального ЦД 1 типу та на фоні введення та нікотинаміду, $M \pm m$ ($n = 6$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет».

Діабет індукував значне підвищення рівня сироваткової лужної фосфатази порівняно з контрольною групою (рис. 5.5). Відомо, що загальна

лужна фосфатаза в сироватці є мембраноутворюючим тетрамерним ферментом, приєднаним до глікозилфосфатидилінозитолових фрагментів, розташованих на зовнішній поверхні клітини [185]. Точна фізіологічна роль лужної фосфатази невідома, хоча дані свідчать, що вона бере участь у мінералізації та розсмоктуванні кісток [186]. Зміни активності ферментів в сироватці можуть бути обумовлені змінами кісткових ізоферментів [187]. Введення НАМ може частково поліпшити зміни структури колагену шляхом нормалізації вмісту вітаміну С, як показано на рис. 5.2 і 5.3, і зниження активності сироваткової лужної фосфатази.

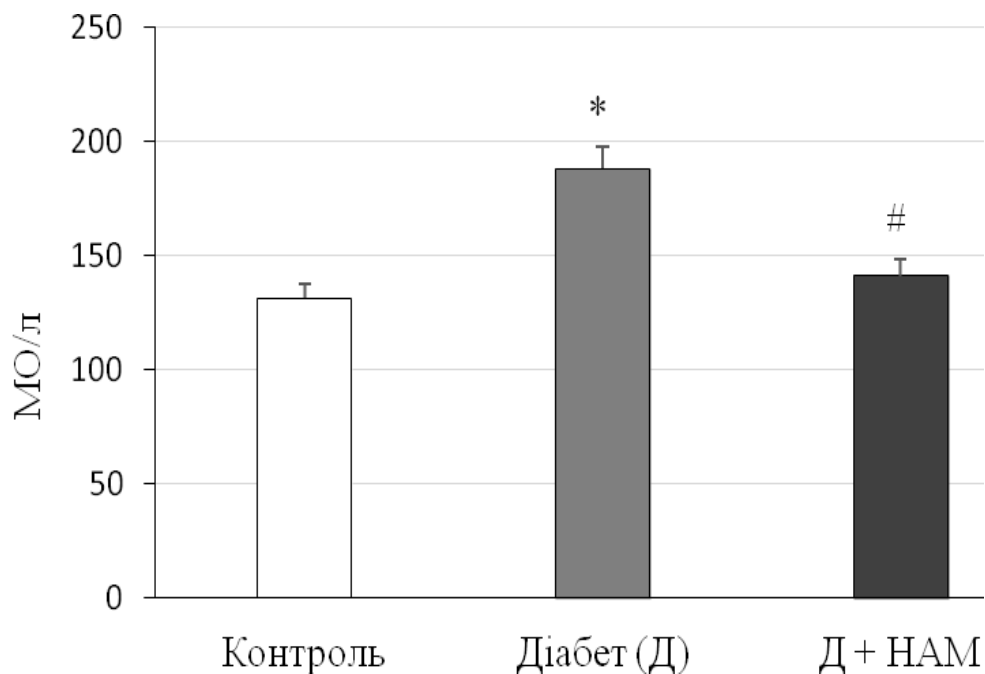


Рис. 5.5. Активність лужної фосфатази у сироватці крові за експериментального ЦД 1 типу та на фоні введення та нікотинаміду, $M \pm m$ ($n = 6$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет».

Крім того, вважається, що одним з основних причин гепатотоксичності є CYP 2E1-залежний оксидативний стрес після індукції стрептозотоцином. Було виявлено більш ніж 2,5-кратне збільшення експресії CYP 2E1 у діабетичних щурів порівняно з контрольною групою, в той час як НАМ

знизив рівень її експресії (рис. 5.6). Допускається, що НАМ може частково знизити рівень токсичності в клітинах, пов'язаної з окислювальним стресом, що викликається індукцією CYP 2E1 при ЦД 1 типу. Не виключено, що зростання рівня експресії CYP 2E1 у печінці діабетичних щурів і тварин, які отримували НАМ, може бути пов'язано безпосереднім або опосередкованим підвищенням рівня кетонів у плазмі.

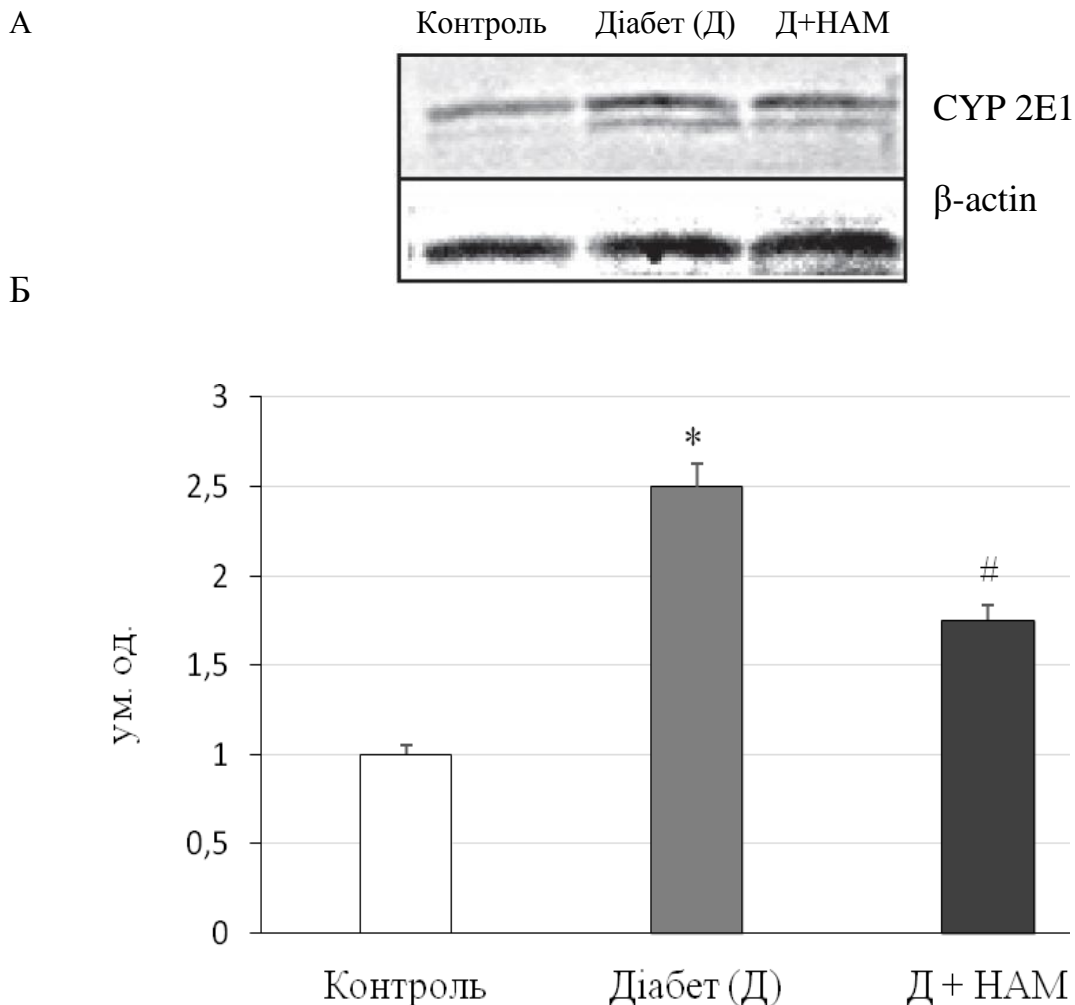


Рис. 5.6. Результати вестерн-блот аналізу: А. Типові блотограми протеїну CYP 2E1 в тканинах печінки щурів за експериментального ЦД 1 типу та на фоні введення та нікотинаміду; Б. Результати денситометрії, що відображають відносний вміст протеїну CYP 2E1 в тканині печінки щурів, $M \pm m$ ($n = 6$). * $P < 0,05$ порівняно з групою «Контроль»; # $P < 0,05$ порівняно з групою «Діабет».

Дослідження передбачуваних змін амінокислотного складу колагену в кістковій тканині у щурів діабетичної групи та якісні зміни синтезу колагену дають нову інформацію, яка може бути використана для визначення ролі аномальних змін у метаболізмі колагену, що свідчить про розвиток діабетичної нейропатії.

Відомо, що зниження рівня гідроксипроліну, проліну і гліцину неминуче впливають на властивості колагенової спіралі. Отримані дані узгоджуються з даними інших авторів, які виявляли порушення структури колагену при індукованому стрептозотоцином діабеті [188, 189]. Зміни у співвідношенні залишків гідроксилізіну : лізіну : гістидину можуть істотно впливати на кількість і тип поперечних зв'язків в колагенових фібрилах, що узгоджується з даними інших авторів [190]. Зміни в кількості аргініну, аспарагінової кислоти, треоніну, залишків серину та глютамінової кислоти можуть викликати зміни в поверхневому заряді молекул колагену, тоді як зміни в кількості метіоніну, ізолейцину, лейцину і фенілаланіну можуть впливати на рівень жорсткості колагенової спіралі [191].

Ці зміни у вмісті залишків аргініну, гліцину та аспарагінової кислоти можуть впливати на кількість доменів Arg-Gly-Asp, які відповідають за процеси адгезії клітин у структурі колагену [192]. Залишки аргініну і гліцину в молекулах колагену знаходяться у спеціальних локусах, які відповідають за взаємодію шаперонів з проколагеном для трансформації у колаген [193]. Додаткова підтримка таких змін у амінокислотному складі колагену типу I полягає в тому, що колаген є сприйнятливим до утворених кінцевих продуктів прогресуючого глікозилування, які накопичуються в результаті гіперглікемії [194]. Вони накопичуються в кістках і можуть негативно впливати на них, перешкоджаючи диференціації остеобластів і продукуванню матричних білків, зокрема колагену [195]. Нещодавно показано, що діабет викликає апоптоз остеобластичних клітин після бактеріального стимулювання [196]. При пригніченні апоптозу спостерігається значне поліпшення здатності до утворення кісткової тканини,

що свідчить про функціональну важливість посиленого апоптозу пов'язаного з діабетом [197]. Ще один механізм, через який діабет може викликати апоптоз, є стимуляція утворення кінцевих продуктів прогресуючого глікозилювання. Природа кінцевих продуктів прогресуючого глікозилювання може бути класифікована як зшивання. Міжмолекулярне зшивання може відбуватися між двома сусідніми молекулами, такими, як лізин до лізину або лізин до залишків аргініну [198]. Модифікація аргініну в межах ділянок RGD і GFOGER розпізнається двома специфічними інтегринами ($\alpha 1\beta 2$ і $\alpha 2\beta 1$) для колагену, зниженими клітинними взаємодіями при оборотах і тромбоцитарних взаємодіях ($\alpha 1\beta 2$). Ці зміни можуть вплинути, наприклад, на відновлення ушкоджених судин і загоєння пошкоджень на шкірі при ЦД. Такі модифікації можуть руйнувати здатність утворення каркасної структури колагену. Глікозилювання під час діабету, таким чином, відповідає за порушення біосинтезу колагену у всіх тканинах та посилює перебіг діабетичної нейропатії [198].

Можна також припустити, що вищезгадані зміни викликані дефіцитом інсуліну, який бере участь у регуляції синтезу колагену на різних стадіях [178]. Крім цього, патологічні зміни у метаболізмі амінокислот при ЦД можуть впливати на зміни метаболізму колагену. Беручи до уваги поліморфізм генів колагену [199], такі зміни можуть бути наслідком порушень у швидкості транскрипції різних генів з однієї надродини колагену типу I, як це було раніше продемонстровано для недосконалого остеогенезу [200].

Зниження рівню гідроксипроліну в діабетичній групі порівняно з контрольною групою в наших експериментах могли бути викликані змінами вмісту вітаміну С. Слід зазначити, що це може мати наслідки для функціонування пролілгідроксилази, ензимом якої є аскорбінова кислота. Більш того, дефіцит вітаміну С може впливати на структуру колагену і позаклітинний матрикс шляхом промоції диференціювання остеобластів шляхом моделюючої взаємодії інтегрину $\alpha 2\beta 1$ колагену типу I [201],

викликаючи організацію позаклітинного матриксу агрегацією колаген синтезуючих клітин [202], регулюючи біосинтез і обіг протеогліканів [203] та зміну рівнів мРНК в клітинах, що синтезують колаген, шляхом зміни швидкості транскрипції [204]. Крім того, аскорбінова кислота також індукувала активність лужної фосфатази, експресію мРНК для білків, які є маркерами остеобластичної диференціації, відкладення кальцію [205] і збільшення швидкості секреції проколагену з клітин у позаклітинний матрикс [206].

Ми спостерігали, як і очікувалося, повне відновлення вмісту вітаміну В₃ після його введення в діабетичній групі, як показано на рис. 5.2 і 5.3. Вибрана висока доза НАМ могла б частково поліпшити зміни структури колагену шляхом нормалізації вмісту вітаміну С. Більш того, у щурів з частковою резекцією підшлункової залози НАМ зберігає функції β-клітин і посилює їх регенерацію [183], [207].

Крім того, також можливо, що такий потенційний терапевтичний ефект може бути пов'язаний з його ефектами як акцептору вільних радикалів, його доступністю як структурного компонента нікотинаміддинуклеотиду (НАД⁺), або з конкурентним інгібуванням полі(АДФ-рибозо)полімерази [183, 207]. Нікотинамід та його біологічно активні похідні 1-метилнікотинамід також мають значну нейропротекторну дію [208].

Існують дані, які також підтверджують здатність введеного нікотинаміду залучатися до синтезу НАДФ⁺, який використовується як носій електронів водню в окисно-відновних реакціях [209]. Не виключено, що збільшення рівня α-токоферолу (рис. 5.3 і 5.4) у діабетичній групі зумовлено помітно зниженим рівнем вітаміну С у сироватці крові та печінці, який виступає донором електронів для вільних радикалів токофероксилу, що може представляти собою тимчасову адаптацію до розвитку оксидативного стресу, пов'язану з ЦД. Наші дослідження не можуть дати пояснення незначного зниження рівня α-токоферолу після введення НАМ.

Таким чином, дані дослідження свідчать про наявність змін у колагені типу I досліджуваних кісток щурів у діабетичній групі. При такій патології можуть утворюватися молекули колагену типу I зі зміненою структурою спіралі, поверхневим зарядом, ригідністю, кількістю і типами поперечних зв'язків і специфічними локусами, що відповідають за клітинну адгезію, взаємодію з шаперонами і перетворенням проколагену в колаген посилюючи порушення у нервовій системі, особливо у периферичній. Такі зміни молекул колагену можуть також вплинути на властивості та правильне функціонування ряду тканин. Зокрема, можуть бути порушені процеси мінералізації.

Припущення про зміни мінералізації колагену добре узгоджується з отриманими нами даними щодо сироваткової лужної фосфатази (рис. 5.5). Відомо, що клінічним проявом вивільнення внутрішньоклітинних ферментів, таких як лужна фосфатаза сироватки крові, в кровообіг, спричинене ЦД, свідчить про те, що цей ензим є може бути маркером пошкодження гепатоцитів [210].

Таким чином, підвищена активність цього ферменту може також вказувати на його вивільнення з клітин і втрату функціональної цілісності клітинних мембран. Введення НАМ призводило до часткової нормалізації цієї зміни. Більш того, підвищений вміст експресія цитохрому P450 2E1 (рис. 5.6) може бути пов'язаний з розвитком окислювального стресу і продукцією активних форм кисню при ЦД, оскільки CYP 2E1 метаболізує такі ендогенні сполуки, як жирні кислоти, гідропероксиди ліпідів, кетонів тіла, альдегіди і більшість ксенобіотиків в нуклеофільні сполуки для їх виділення із організму [211]. Отже застосування НАМ у діабетичних щурів може мати протекторні властивості за рахунок окислативного стресу пов'язаного CYP 2E1.

Водночас варто зазначити, що зміни амінокислотного складу колагену можуть бути як причиною, так і наслідком патології кісткової тканини при ЦД. Наше дослідження підтверджує взаємозв'язок між зниженням вмісту

колагену типу I у діабетичній групі тварин, зміною їх амінокислотного складу та порушенням біодоступності вітамінів. Позитивні ефекти застосування НАМ на синтез і метаболізм колагену, крім інших можливих факторів, можуть бути пов'язані із підтриманням функцій вітаміну С і Е.

Отримані дані свідчать про можливість використання нікотинаміду для внесення його до складу існуючих терапевтичних засобів для профілактики і лікування діабету 1 типу, а також для корекції метаболічних процесів, пов'язаних з цукровим діабетом.

За умов *in vitro* було показано, що СТЗ призводить до порушень у функціонуванні мітохондрій, які були виділені із мозку контрольних щурів, доказом чого є пригнічення загальної дегідрогеназної активності. При застосуванні НАМ на тлі дії СТЗ було встановлено його здатність частково знижувати загальну дегідрогеназну активність мітохондрій, що свідчить про його протекторну дію.

Більше того нами було показано, що за інсулін резистентності у щурів також можуть виникати ускладнення, зокрема діабетична нейропатія, свідченням чого може бути підвищення рівня сечової кислоти в крові, а також рівня НАД⁺ в тканинах печінки, нирках, серця та мозку та зниження активності Na⁺, K⁺-АТФази нервових закінчень головного мозку.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Цукровий діабет (ЦД) є багатофакторним метаболічним захворюванням, яке негативно впливає на більшість обмінних шляхів і призводить до виникнення численних ускладнень, що є на даний час одним з найактуальніших проблем, яка потребує науково-обґрунтованого вирішення. Станом на 2019 рік у світі зареєстровано близько 463 мільйонів хворих на це захворювання, і за прогнозами ВОЗ їх кількість до 2045 року може досягти 700 мільйонів [1], у тому числі біля 1,5 мільйонна 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, які в свою чергу, призводять до значної захворюваності та смертності, що потребує значних витрат на їх лікування [222]. Не дивлячись на те, що периферична діабетична нейропатія (ДПН) є найбільш частим і очевидним ускладненням діабету та асоціюється із збільшенням смертності, головним чином, як результат виникнення виразки стопи та невропатичного болю [223], дисфункції мозку, особливо за ДПН зазвичай часто характеризуються розвитком депресії, стану тривоги, розладів сну, і як наслідок, зниженням якості життя [224]. Саме тому серед численних ускладнень ЦД значна увага приділяється з'ясуванню біохімічних механізмів, які лежать в основі розвитку діабетичної нейропатії (ДН), за якої порушується провідність нервів, виникають когнітивні та поведінкові розлади тощо. Слід зазначити, що 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 також негативно впливають на якість життя. Більше того, діабет є фактором ризику розвитку хвороби Альцгеймера та Паркінсона, судинної деменції та інших захворювань нервової системи, оскільки вважають, що за ЦД саме у головному мозку відбуваються метаболічні,

структурні та функціональні порушення, які призводять до його прискореного старіння [2,3].

Актуальним питанням при дослідженні патогенетичних механізмів, які лягли в основу розвитку патологічних процесів у клітині та порушення регулювання їх функцій за цукрового діабету 1 типу є з'ясування ролі та зв'язку процесів полі-АДФ-рибозилування протеїнів із іншими біологічними процесами при патологіях та за їх норми. Одним із перспективних напрямків лікування ЦД та його ускладнень є розробка та синтез специфічних інгібіторів PARP-1, основного ядерного ензиму процесів полі-АДФ-рибозилування, які б володіли антиоксидантними та протизапальними властивостями. У зв'язку з цим, для досліджень були вибрані відмінні за своєю структурно наступні інгібітори PARP-1, такі як нікотинамід (НАМ) та 1,5-ізохіноліндіол (ІХД), дія яких, як було припущено, могла б реалізуватися на рівні регуляції та нормалізації ряду патогенетичних механізмів індукованих ЦД, що сприяло б вирішенню актуальної медико-соціальної проблеми лікування цього захворювання та його ускладнень.

Отже, проведені експериментальні дослідження дозволяють узагальнити та систематизувати отримані вперше результати та доповнити існуючі відомості щодо метаболічних шляхів, через які здійснюється дія специфічних інгібіторів PARP-1, основного ензиму процесів полі-АДФ-рибозилування ядерних протеїнів, таких як структурно відмінних інгібіторів першого та другого покоління НАМ та ІХД за умов розвитку дисфункцій головного мозку, індукованих експериментальним ЦД 1 типу.

Доказом розвитку цукрового діабету 1 типу та відтворення адекватної експериментальної моделі було суттєве підвищення концентрації глюкози крові та зниження маси тіла у щурів. При застосуванні НАМ та ІХД протягом 14 діб, жоден із використаних інгібіторів не призводив до підвищення маси тіла тварин та достовірно не впливав на рівень глюкози крові.

У ході проведення досліджень виявлено зміни у перерозподілі між двома основними типами лейкоцитів, агранулоцитами та гранулоцитами.

Застосування НАМ лише частково відновлювало рівновагу між цими типами, у той час як за впливу ІХД цей параметр досягав рівня контролю. Разом з тим отримані результати підтвердили, що за гіперглікемії відбувається розвиток оксидативного стресу, доказом чого було підвищення рівня АФК в лейкоцитах крові, рівень яких знижувався при використанні інгібіторів PARP-1, причому більш ефективно за дії НАМ у порівнянні із дією ІХД. Гіперглікемія та оксидативний стрес супроводжувалися інтенсифікацією прозапальних процесів, про що свідчить підвищення вмісту цитокінів IFN- γ , IL-1 α , моноцитарного хемотаксичного протеїну-1 у сироватці крові діабетичних щурів. Однак, саме при використанні ІХД була встановлена його протизапальна дія про що свідчить зниження рівня моноцитарного хемотаксичного протеїну-1. Разом із тим, оцінка рівнів цитокінів дозволила отримати інформацію щодо функціональної активності різних типів імунокомпетентних клітин та ступінь розвитку запальних процесів.

При з'ясування ролі інгібіторів PARP-1 у дисфункціях мозку за ЦД 1 типу встановлено на основі оцінки рівня експресії PARP-1, його фрагментів та інших ключових протеїнів, що порушення функцій цих протеїнів може призводити до розвитку багатьох нейродегенеративних захворювань. При цьому слід зазначити, що інтенсифікація процесів полі-АДФ-рибозилування ядерних протеїнів за цукрового діабету 1 типу також буде впливати на інші НАД-залежні процеси, оскільки для цих процесів НАД⁺ є спільним субстратом.

Не дивлячись на те що на рівні експресії PARP-1 та його фрагментів в екстрактах мозку діабетичних тварин відбуваються зміни, на рівні експресії мРНК гену *Parp-1* зміни не виявлені. Розвиток ЦД 1 типу на всіх його етапах призводить до посилення розвитку апоптотичних процесів, свідченням чого є збільшення вмісту рибозильованих протеїнів, зокрема протеолітичне розщеплення самого ензиму PARP-1 на фрагменти 27 кДа та 89 кДа. Це може бути маркером ранньої стадії апоптозу у клітинах мозку. Свідченням розвитку апоптотичних процесів є результати, які продемонстрували

збільшення активності ензиму PARP-1 в ядрах тканини головного мозку щурів, яку було оцінено за кількістю радіоактивно міченого АДФ-рибозного фрагменту НАД⁺, який було включено до загальних ядерних протеїнів клітин головного мозку щурів. Варто зазначити, що обидва досліджувані інгібітори PARP-1, як ІХД так і НАМ спричиняли інгібуючу дію на активність PARP-1, що свідчить про їх коригуючий вплив на процеси полі-АДФ-рибозилування ядерних протеїнів за умов їх тривалого введення.

Однак, досліджувані інгібітори PARP-1 проявляли лише незначну коригуючу дію на рівень експресії НАД-залежної деацетилази СІРТ1 в ядерних екстрактах мозку діабетичних щурів, який був знижений за умов гіперглікемії. Оскільки деацетилаза СІРТ1, як і PARP-1 також є НАД-залежним ензимом, то цілком ймовірно, що вони можуть конкурувати за доступність вільного НАД⁺, тим самим призводити до зниження його вмісту у клітинах.

Тому, не виключено, що всі вищезазначені зміни можуть бути результатом зниження вмісту НАД⁺ та зниження всісту співвідношення вільних НАД⁺/НАДН у головному мозку діабетичних щурів, що, в свою чергу, призводитиме до порушень регуляторних процесів в клітинах центральної нервової системи. Отримані результати, які продемонстрували, що введення ІХД та НАМ діабетичним щурам підвищувало співвідношення вільних НАД⁺/НАДН пар в мозку є доказом коригуючої дії цих інгібіторів PARP-1 на регуляторні процеси в клітинах мозку.

Тобто, використання інгібіторів PARP-1 може бути перспективним терапевтичним підходом, спрямованим на корекцію вторинних ускладнень ЦД 1 типу, у тому числі процесів, асоційованих з полі-АДФ-рибозилуванням.

Встановлена активація регуляторного транскрипційного фактору NFκB у мозку за ЦД 1 типу, свідченням чого є збільшення його вмісту, може в свою чергу, індукувати зміни експресії різних генів, протеїни яких будуть посилювати запалення та оксидативний стресс (ОС), викликаючи апоптоз, що

може призводити до індукованої окисдатовним стресом дисфункцій клітин та навіть їх загибелі. За тривалого введення НАМ діабетичним щурам відбувалося незначне зниження рівня експресії NF-κB, тобто пригнічення проапоптотичних процесів.

Отримані нами результати також свідчать про те, що застосування нікотинаміду запобігає розвитку діабетичної периферичної нейропатії шляхом впливу на нормалізацію вмісту колагену у гомілкових кістках діабетичних щурів, який знижений за умов гіперглікемії. Така дія нікотинаміду на біосинтез колагену може реалізуватися за участі піридину динуклеотидів, шляхом нормалізації метаболізму амінокислот, які входять до складу колагену досліджуваних кісток, а також за рахунок НАДФН-залежної регенерації вітаміну С з подальшим відновленням токоферолів. Тобто, нами було показано, що цукровий діабет 1 типу також супроводжується розвитком порушень у поперечному зв'язуванні колагену, про що свідчить зниження вмісту колагену та зміни у перерозподілі амінокислот, які мають безпосередній вплив на структуру спіралі, жорсткість і поперечні зв'язки колагену. Отримані дані продемонстрували зміни у співвідношені Фішера, які частково нормалізуються введенням НАМ. Було також відмічено зниження вмісту вітамінів С та В₃ у сироватці крові та у печінці, що може бути пов'язано з їх підвищеною потребою за рахунок зростання окисдатовного стресу виявленого в різних тканинах діабетичних щурів, а також через зменшення НАДФН-залежної регенерації вітаміну С.

Підтвердженням наших результатів можуть бути дослідження, автори яких встановили, що вітамін В₃ може пригнічувати експресію генів проколагену типу I і III на рівні транскрипції генів на моделі блеоміцинового фіброзу легень у хом'яків [225]. Проведені дослідження встановили відновлення вмісту вітаміну В₃ у кровообігу та печінці і незначне зниження рівня α-токоферолу, який є найбільш поширеним акцептором пероксильних радикалів, за введення НАМ діабетичним щурам.

Слід зазначити, що ці дослідження були проведені не тільки для того щоб оцінити зміни у складі амінокислот кісткової тканини при стрептозотоцин-індукованому ЦД 1 типу та встановити характер функціональної взаємодії з вітамінами залученими до синтезу колагену, але і для того щоб переконатися в тому, що дисфункції мозку відбуваються разом або опосередковано з розвитком периферичної діабетичної нейропатії.

Результати проведених досліджень дозволили переконатися у тому, що нікотинамід, може бути лікарським засобом в досліджуваній терапевтичній дозі, оскільки має широкий спектр метаболічних ефектів, запобігаючи структурним, метаболічним та функціональним змінам індукованим ЦД 1 типу як за діабетичної енцефалопатії, так і за діабетичної периферичної нейропатії.

Таким чином, механізми дії досліджуваних інгібіторів PARP-1 за індукованих ЦД 1 типу метаболічних, структурних та функціональних порушень можуть реалізуватися шляхом принаймні часткової нормалізації оксидативного стресу, запальних процесів, які призводять до змін у лейкоцитах крові, відновлення вмісту НАД⁺, який є субстратом процесів полі-АДФ-рибозилування ядерних протеїнів та сіртуїнів, підвищення співвідношення вільних НАД⁺/НАДН у мозку, пригнічення транскрипційного фактору NF-κB, зниження активності ензиму PARP-1, його вмісту, запобігаючи фрагментації ензиму.

Узагальнюючи отримані результати, стає очевидним, що за діабетичної нейропатії дія досліджуваних інгібіторів PARP-1 здійснюється на рівні всіх взаємопов'язаних між собою процесах, зокрема на рівні гіперглікемії, активації оксидативного стресу, апоптозу, що свідчить про можливість їх використання при розробці нових терапевтичних препаратів для лікування цукрового діабету 1 типу та численних його ускладнень, зокрема діабетичної нейропатії.

ВИСНОВКИ

Результати та узагальнення дослідження, отримані згідно поставленої мети дисертаційної роботи, поглиблюють існуючі теоретичні уявлення щодо механізмів дії інгібіторів PARP-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 PARP-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 PARP-1, що призводить до 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 ядрних фракціях головного мозку діабетичних щурів та істотне зниження вмісту НАД-залежної деацетилази 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 I в великогемілкових та малогемілкових кістках діабетичних щурів, та виявлена нормалізуюча дія лише НАМ на вміст колагену та співвідношення Фішера, що запобігає розвитку периферичної діабетичної нейропатії.

Список використаних джерел

1. Cho N.H., Shaw J.E., Karuranga S., Huang Y., da Rocha Fernandes J.D., Ohlrogge A.W., Malanda B. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018; 138: 271-281.
2. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005; 54(6): 1615–1625.
3. Yao D., Brownlee M. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (rage) and rage ligands. *Diabetes.* 2010; 59(1): 249–255.
4. Bril V, Breiner A, Perkins B, Zochodne DW. Neuropathy. *Canadian Journal of Diabetes.* 2018; 42: 217–221.
5. Tabit C.E., Chung W.B., Hamburg N.M., Vita J.A. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. *Reviews in endocrine & metabolic disorders.* 2010; 11(1): 61–74.
6. Kolluru G.K., Bir S.C., Kevil C.G. Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. *International Journal of Vascular Medicine.* 2012: 918267. <https://doi.org/10.1155/2012/918267>.
7. Gabbay, K.H. Aldose reductase inhibition in the treatment of diabetic neuropathy: where are we in 2004? *Current Diabetes Reports.* 2004; 4: 405-408.
8. Obrosova I.G., Li F., Abatan O.I., Forsell M.A., Komjati K., Pacher P., Szabo C., Stevens M.J. Role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in diabetic neuropathy. *Diabetes.* 2004; 53: 711-720.
9. Vida A., Abdul-Rahman O., Mikó E., Brunyánszki A., Bai P. Poly(ADP-Ribose) Polymerases in Aging - Friend or Foe? *Curr Protein Pept Sci.* 2016; 17(7): 705-712.

10. Jagtap P., Szabó C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4(5): 421-440.
11. Brownlee M., Cerami A., Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *The New England Journal of Medicine.* 1988; 318: 1315-1321.
12. Bishnoi M., Bosgraaf C.A., Abooj M., Zhong L., Premkumar L.S., 2011. Streptozotocin-induced early thermal hyperalgesia is independent of glycemic state of rats: role of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and inflammatory mediators. *Molecular Pain.* 2011; 7: 52.
13. Steinbacher B.C., Nadelhaft I. Increased levels of nerve growth factor in the urinary bladder and hypertrophy of dorsal root ganglion neurons in the diabetic rat. *Brain Research.* 1998; 782: 255-260.
14. Terenghi G., Mann D., Kopelman P.G., Anand P. trkA and trkC expression is increased in human diabetic skin. *Neuroscience Letters.* 1997; 228: 33-36.
15. Osman A.A., Dahlin L.B., Thomsen N.O., Mohseni S. Autophagy in the posterior interosseous nerve of patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus: an ultrastructural study. *Diabetologia.* 2015; 58: 625-632.
16. Folestad A., Alund M., Asteberg S., Fowelin J., Aurell Y., Gothlin J., Cassuto J. Role of Wnt/beta-catenin and RANKL/OPG in bone healing of diabetic Charcot arthropathy patients. *Acta Orthopaedica.* 2015; 86: 415-425.
17. Kellogg A.P., Wiggin T.D., Larkin D.D., Hayes J.M., Stevens M.J., Pop-Busui R. Protective effects of cyclooxygenase-2 gene inactivation against peripheral nerve dysfunction and intraepidermal nerve fiber loss in experimental diabetes. *Diabetes.* 2007; 56: 2997-3005.
18. Obrosova I.G., Stavniichuk R., Drel V.R., Shevalye H., Vareniuk I., Nadler J.L., Schmidt R.E. Different roles of 12/15-lipoxygenase in diabetic large and small fiber peripheral and autonomic neuropathies. *The American Journal of Pathology.* 2010; 177: 1436-1447.

19. Hashim Z., Zarina S. Osmotic stress induced oxidative damage: possible mechanism of cataract formation in diabetes. *Journal of Diabetes and Its Complications*. 2012; 26(4): 275–279.
20. Obrosova I. G. Increased sorbitol pathway activity generates oxidative stress in tissue sites for diabetic complications. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2005; 7(11-12): 1543–1552.
21. Temussi P.A., Masino L., Pastore A. From alzheimer to huntington: why is a structural understanding so difficult? *The EMBO journal*. 2003; 22(3): 355–361.
22. Nathan D.M., Genuth S., Lachin J., Cleary P., Crofford O., M Davis, Rand L., Siebert C. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. the diabetes control and complications trial research group / *The New England Journal of Medicine*. 1993; 329(14): 977–986.
23. Hwang Y.C., Bakr S., Ellery C.A., Oates P.J., Ramasamy R. Sorbitol dehydrogenase: a novel target for adjunctive protection of ischemic myocardium. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003; 17(15): 2331–2333.
24. Yudkin J.S., Forrest R.D., Jackson C.A., Ryle A.J., Davie S., Gould B.J. Unexplained variability of glycated haemoglobin in non-diabetic subjects not related to glycaemia. *Diabetologia*. 1990; 33(4): 208–215.
25. Monnier L., Luthra M., Balasubramanian D. Contributions of fasting and postprandial plasma glucose. a study of two eye lens crystallins. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993; 268(24): 18119–18127.
26. McFarland K.F., Catalano E.W., Day J.F., Thorpe S.R., Baynes J.W. Nonenzymatic glycosylation of serum proteins in diabetes mellitus. *Diabetes*. 1979; 28(11): 1011–1014.
27. Monnier L., Lapinski H., Colette C. Contributions of fasting and postprandial plasma glucose increments to the overall diurnal hyperglycemia of type 2

- diabetic patients: variations with increasing levels of hba(1c). *Diabetes Care*. 2003; 26(3): 881–885.
28. Du X.L., Edelstein D., Rossetti L., Fantus I.G., Goldberg H., Ziyadeh F., Wu J., Brownlee M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing sp1 glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000; 97(22): 12222–12226.
29. Nakatani Y., Kaneto H., Kawamori D., Yoshiuchi K., Hatazaki M., Matsuoka T.A., Ozawa K., Ogawa S., et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(1): 847–851.
30. Koya D., King G.L. Protein kinase c activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 1998; 47(6): 859–866.
31. Ha H., Yu M.R., Choi Y.J., Lee H.B. Activation of protein kinase c-delta and c-epsilon by oxidative stress in early diabetic rat kidney. *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation*. 2001; 38(4 Suppl 1): 204–207.
32. Huisman T. H., Dozy A.M. Studies on the heterogeneity of hemoglobin. v. binding of hemoglobin with oxidized glutathione. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1962; 60: 302–319.
33. Iberg N., Flückiger R. Nonenzymatic glycosylation of albumin in vivo. identification of multiple glycosylated sites. *The Journal of Biological Chemistry*. 1986; 261(29): 13542–13545.
34. Kim H.J., . R. Hwang R., Lee K.J. Heat shock responses for understanding diseases of protein denaturation. *Molecules and Cells*. 2007; 23(2): 123–131.
35. Zuo L., Du Y., Lu M., Gao J., Hu R., Zhang S., Wang Y., Zhu H. Atorvastatin inhibits hyperglycemia-induced expression of osteopontin in the diabetic rat kidney via the p38 mapk pathway. *Molecular Biology Reports*. 2014; 41(4): 2551–2558.

36. Khan S., Jena G.B. Protective role of sodium butyrate, a hdac inhibitor on beta-cell proliferation, function and glucose homeostasis through modulation of p38/erk mapk and apoptotic pathways: study in juvenile diabetic rat. *Chemico-Biological Interactions*. 2014; 213: 1–12.
37. Youl E., Magous R., Cros G., Oiry C. Map kinase cross talks in oxidative stress-induced impairment of insulin secretion. involvement in the protective activity of quercetin . *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2014; 28(6): 608–615.
38. Wu Y., Feng B., Chen S., Zuo Y., Chakrabarti S. Glucose-induced endothelin-1 expression is regulated by erk5 in the endothelial cells and retina of diabetic rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2010; 88(6): 607–615.
39. Zhang Z., Luo X., Ding S., Chen J., Chen T., Chen X., Zha H., Yao L., et al. Microna-451 regulates p38 mapk signaling by targeting of ywhaz and suppresses the mesangial hypertrophy in early diabetic nephropathy. *FEBS letters*. 2012; 586(1): 20–26.
40. Stavniichuk R., Obrosova A.A., Drel V.R., Nadler J.L., Obrosova I.G., Yorek M.A. 12/15-lipoxygenase inhibition counteracts mapk phosphorylation in mouse and cell culture models of diabetic peripheral neuropathy. *Journal of Diabetes Mellitus*. 2013 Aug; 3(3): 10.4236/jdm.2013.33015.
41. Khan Z.A., Barbin Y.P., Farhangkhoe H., Beier N., Scholz W., Chakrabarti S. Glucose-induced serum- and glucocorticoid-regulated kinase activation in oncofetal fibronectin expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005; 329(1): 275–280.
42. Bunn H.F., Gabbay K.H., Gallop P.M. The glycosylation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus. *Science (New York, N.Y.)*. 1978; 200(4337): 21–27.
43. DeGroot J. The age of the matrix: chemistry, consequence and cure. *Current Opinion in Pharmacology*. 2004; 4(3): 301–305.

44. Bierhaus A., Hofmann M.A., Ziegler R., Nawroth P.P. Ages and their interaction with age-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. i. the age concept. *Cardiovascular Research*. 1998; 37(3): 586–600.
45. Nawale R. B., Mourya V.K., Bhise S.B. Non-enzymatic glycation of proteins: a cause for complications in diabetes. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 2006; 43(6): 337–344.
46. Bierhaus A., Nawroth P.P. Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for age (rage) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. *Diabetologia*. 2009; 52(11): 2251–2263.
47. Chong Z.Z., Shang Y.C., Maiese K. Vascular injury during elevated glucose can be mitigated by erythropoietin and Wnt signaling. *Curr. Neurovasc. Res*. 2007; 4: 194–204.
48. Gehrman W., Elsner M., Lenzen S. Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic beta-cells. *Diabetes Obes. Metab*. 2010; (Suppl. 2): 149–158.
49. Maiese K., Morhan S.D., Chong Z.Z. Oxidative stress biology and cell injury during type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Curr. Neurovasc. Res*. 2007; 4: 63–71.
50. Lin J.H., Walter P., Yen T.S.B. Endoplasmic Reticulum Stress in Disease Pathogenesis *Annual Review of Pathology. Mech. Disease*. 2008; 3: 399–425.
51. Eizirik D.L., Cardozo A.K., Cnop M. The Role for Endoplasmic Reticulum Stress in Diabetes Mellitus. *Endocr. Rev*. 2008; 29(1): 42–61.
52. Weijers R.N.M. Lipid composition of cell membranes and its relevance in type 2 diabetes mellitus. *Current Diabetes Reviews*. 2012; 8(5): 390–400.
53. Tahara Y., Shima K. Kinetics of hba1c, glycated albumin, and fructosamine and analysis of their weight functions against preceding plasma glucose level. *Diabetes Care*. 1995; 18(4): 440–447.

54. Goldin A., Beckman J.A., Schmidt A.M., Creager M.A. Advanced glycation end products sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006; 114(6): 597–605.
55. Rodriguez-Pallares J., Rey P., Parga J.A., Muñoz A., Guerra M.J., Labandeira-Garcia J.L. Brain angiotensin enhances dopaminergic cell death via microglial activation and nadph-derived ros. *Neurobiology of Disease*. 2008; 31(1): 58–73.
56. Olivieri J.R., Craievich A.F. The subdomain structure of human serum albumin in solution under different ph conditions studied by small angle x-ray scattering. *European biophysics journal: EBJ*. 1995; 24(2): 77–84.
57. Giacco F., Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*. 2010; 107(9): 1058–1070.
58. Sell D.R., Carlson C., Monnier V.M. Differential effects of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus on pentosidine formation in skin and glomerular basement membrane. *Diabetologia*. 1993; 36(10): 936–941.
59. Golia B., Singh H.R., Timinszky G. Poly-adp-ribosylation signaling during dna damage repair. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*. 2015; 20: 440–457.
60. Krishnakumar R., Kraus W.L. The parp side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Molecular cell*. 2010; 39(1): 8–24.
61. Schreiber V., Dantzer F., Ame J.C., Murcia G. Poly(adp-ribose): novel functions for an old molecule. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2006; 7(7): 517–528.
62. Kim M.Y., Zhang T., Kraus W.L. Poly(adp-ribosyl)ation by parp-1: “parlaying” nad⁺ into a nuclear signal. *Genes & development*. 2005; 19(17): 1951–1967.
63. Hottiger M.O., Hassa P.O., Lüscher B., Schüler H., Koch-Nolte F. Toward a unified nomenclature for mammalian adp-ribosyltransferases. *Trends in biochemical sciences*. 2010; 35(4): 208–219.

64. Citarelli M., Teotia S., Lamb R.S. Evolutionary history of the poly(adp-ribose) polymerase gene family in eukaryotes. *BMC evolutionary biology*. 2010; 10: 308.
65. D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G.G. Poly(adp-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *The Biochemical journal*. 1999; 342(Pt 2): 249–268.
67. Ogata N., Ueda K., Kagamiyama H., Hayaishi O. Adp-ribosylation of histone h1. identification of glutamic acid residues 2, 14, and the cooh-terminal lysine residue as modification sites. *The Journal of biological chemistry*. 1980; 255(16): 7616–7620.
68. Alvarez-Gonzalez R., Jacobson M.K. Characterization of polymers of adenosine diphosphate ribose generated in vitro and in vivo. *Biochemistry*. 1987; 26(11): 3218–3224.
69. Bogan K.L., Brenner C. Nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinamide riboside: a molecular evaluation of nad⁺ precursor vitamins in human nutrition. *Annual review of nutrition*. 2008; 28: 115–130.
70. Cervantes-Laurean D., Jacobson E.L., Jacobson M.K. Glycation and glycooxidation of histones by adp-ribose. *The Journal of biological chemistry*. 1996; 271(18): 10461–10469.
71. Altmeyer M., Messner S., Hassa P.O., Fey M., Hottiger M.O. Molecular mechanism of poly(adp-ribosyl)ation by parp1 and identification of lysine residues as adp-ribose acceptor sites. *Nucleic acids research*. 2009; 37(11): 3723–3738.
72. Adamietz P., Rudolph A. Adp-ribosylation of nuclear proteins in vivo. identification of histone h2b as a major acceptor for mono- and poly(adp-ribose) in dimethyl sulfate-treated hepatoma ah 7974 cells. *The Journal of biological chemistry*. 1984; 259(11): 6841–6846.
73. Bártoová E., Krejčí J., Harnicarová A., Galiová G., Kozubek S. Histone modifications and nuclear architecture: a review. *The journal of histochemistry*

- and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society. 2008; 56(8): 711–721.
74. Aldinucci A., Gerlini G., Fossati S., Cipriani G., Ballerini C., Biagioli T., Pimpinelli N., Borgognoni L., Massacesi L., Moroni F., Chiarugi A. A key role for poly(adp-ribose) polymerase-1 activity during human dendritic cell maturation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 2007; 179(1): 305–312.
75. Barkauskaite E., Jankevicius G., Ladurner A.G., Ahel I., Timinszky G. The recognition and removal of cellular poly(adp-ribose) signals. *FEBS Journal*. 2013; 280(15): 3491–3507.
76. Mendoza-Alvarez H., Alvarez-Gonzalez R. Poly(adp-ribose) polymerase is a catalytic dimer and the automodification reaction is intermolecular. *The Journal of biological chemistry*. 1993; 268(30): 22575–22580.
77. Rouleau M., Aubin R.A., Poirier G.G. Poly(adp-ribosyl)ated chromatin domains: access granted. *Journal of cell science*. 2004; 117(Pt 6): 815–825.
78. Whitacre C.M., Hashimoto H., Tsai M.L., Chatterjee S., Berger S.J., Berger N.A. Involvement of nad-poly(adp-ribose) metabolism in p53 regulation and its consequences. *Cancer research*. 1995; 55(17): 3697–3701.
79. Bonicalzi M.E., Haince J.F., Droit A., Poirier G.G. Regulation of poly(adp-ribose) metabolism by poly(adp-ribose) glycohydrolase: where and when? *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2005; 62(7-8): 739–750.
80. Blenn C., Wyrsh P., Althaus F.R. The ups and downs of tannins as inhibitors of poly(adp-ribose)glycohydrolase. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2011; 16(2): 1854–1877.
81. Oka J., Ueda K., Hayaishi O., Komura H., Nakanishi K. Adp-ribosyl protein lyase. purification, properties, and identification of the product. *The Journal of biological chemistry*. 1984; 259(2): 986–995.
82. Meyer-Ficca M.L., Meyer R.G., Coyle D.L., Jacobson E.L., Jacobson M.K. Human poly(adp-ribose) glycohydrolase is expressed in alternative splice

- variants yielding isoforms that localize to different cell compartments. *Experimental cell research*. 2004; 297(2): 521–532.
83. Fahrer J., Kranaster R., Altmeyer M., Marx A., Bürkle A. Quantitative analysis of the binding affinity of poly(adp-ribose) to specific binding proteins as a function of chain length. *Nucleic acids research*. 2007; 35(21): e143.
84. Pleschke J.M., Kleczkowska H.E., Strohm M., Althaus F.R. Poly(adp-ribose) binds to specific domains in dna damage checkpoint proteins. *The Journal of biological chemistry*. 2000; 275(52): 40974–40980.
85. Davidovic L., Vodenicharov M., Affar E.B., Poirier G.G. Importance of poly(adp-ribose) glycohydrolase in the control of poly(adp-ribose) metabolism. *Experimental cell research*. 2001; 268(1): 7–13.
86. Jacobson E.L., Cervantes-Laurean D., Jacobson M.K. Glycation of proteins by adp-ribose. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1994; 138(1-2): 207–212.
87. Ono T., Kasamatsu A., Oka S., Moss J. The 39-kda poly(adp-ribose) glycohydrolase arh3 hydrolyzes o-acetyl-adp-ribose, a product of the sir2 family of acetyl-histone deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; 103(45): 16687–16691.
88. Petrucco S. Sensing dna damage by parp-like fingers. *Nucleic acids research*. 2003; 31(23): 6689–6699.
89. Jagtap P., Szabó C. Poly(adp-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005; 4(5): 421–440.
90. Kaufmann S.H., Desnoyers S., Ottaviano Y., Davidson N.E. Poirier G.G. Specific proteolytic cleavage of poly(adp-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer research*. 1993; 53(17): 3976–3985.
91. Tao Z., Gao P., Liu H. Identification of the adp-ribosylation sites in the parp-1 automodification domain: analysis and implications. *Journal of the American Chemical Society*. 2009; 131(40): 14258–14260.

92. Buki K.G., Bauer P.I., Hakam A., Kun E. Identification of domains of poly(adp-ribose) polymerase for protein binding and self-association. *The Journal of biological chemistry*. 1995; 270(7): 3370–3377.
93. Ruf A., Murcia M.J., Murcia G., Schulz G.E. Structure of the catalytic fragment of poly(ad-ribose) polymerase from chicken. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996; 93(15): 7481–7485.
94. Shaw J.E., Sicree R.A., Zimmet P.Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*. 2010; 87(1): 4–14.
95. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008; 51(2): 216–226.
96. Pandya K.G., Patel M.R, Lau-Cam C.A. Comparative study of the binding characteristics to and inhibitory potencies towards parp and in vivo antidiabetogenic potencies of taurine, 3-aminobenzamide and nicotinamide. *Journal of biomedical science*. 2010; 17(Suppl 1): S16.
97. Masutani M., Suzuki H., Kamada N., Watanabe M., Ueda O., Nozaki T., Jishage K., Watanabe T., et al. Poly(adp-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to streptozotocin-induced diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999; 96(5): 2301–2304.
98. Takasawa S., Yamamoto H., Terazono K., Okamoto H. Novel gene activated in rat insulinomas. *Diabetes*. 1986; 35(10): 1178–1180.
99. Negi G., Kumar A., Sharma S.S. Concurrent targeting of nitrosative stress-parp pathway corrects functional, behavioral and biochemical deficits in experimental diabetic neuropathy. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010; 391(1): 102–106.
100. Schmitz H.D. Reversible nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase upon serum depletion. *European journal of cell biology*. 2001; 80(6): 419–427.

101. Du X., Matsumura T., Edelstein D., Rossetti L., Zsengellér Z., Szabó C., Brownlee M. Inhibition of gapdh activity by poly(adp-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *The Journal of clinical investigation*. 2003; 112(7): 1049–1057.
102. Drel V.R., Xu W., Zhang J., Kador P.F., Ali T.K., Shin J., Julius U., Slusher B., et al. Poly(adp-ribose)polymerase inhibition counteracts cataract formation and early retinal changes in streptozotocin-diabetic rats. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009; 50(4): 1778–1790.
103. Kuchmerovska T., Shymanskyi I., Donchenko G., Kuchmerovskyy M., Pakirbaieva L., Klimenko A. Poly(adp-ribosyl)ation enhancement in brain cell nuclei is associated with diabetic neuropathy. *Journal of diabetes and its complications*. 2004; 18(4): 198–204.
104. Shevalye H., Stavniichuk R., Xu W., Zhang J., Lupachyk S., Maksimchyk Y., Drel V.R., Floyd E.Z., et al. Poly(adp-ribose) polymerase (parp) inhibition counteracts multiple manifestations of kidney disease in long-term streptozotocin-diabetic rat model. *Biochemical pharmacology*. 2010; 79(7): 1007–1014.
105. Stoica B.A., Loane D.J., Zhao Z., Kabadi S.V., Hanscom M., Byrnes K.R., Faden A.I. Parp-1 inhibition attenuates neuronal loss, microglia activation and neurological deficits after traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*. 2014; 31(8): 758–772.
106. Banasik M., Komura H., Shimoyama M., Ueda K. Specific inhibitors of poly(adp-ribose) synthetase and mono(adp-ribosyl)transferase. *The Journal of biological chemistry*. 1992; 267(3): 1569–1575.
107. Mohammad G., Siddiquei M.M., Abu El-Asrar A.M. Poly (adp-ribose) polymerase mediates diabetes-induced retinal neuropathy, poly (adp-ribose) polymerase mediates diabetes-induced retinal neuropathy. *Mediators of Inflammation, Mediators of Inflammation*. 2013; 2013:510451. doi: 10.1155/2013/510451.

108. Olszanecki R., Gebska A., Jawień J., Jakubowski A., Korbut R. Inhibition of nos-2 induction in lps-stimulated j774.2 cells by 1, 5-isoquinolinediol, an inhibitor of parp. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*. 2006; 57(1): 109–117.
109. Rumi G., Tsubouchi R., Nishio H., Kato S., Mózsik G., Takeuchi K. Dual role of endogenous nitric oxide in development of dextran sodium sulfate-induced colitis in rats. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*. 2004; 55(4): 823–836.
110. Gebska A., Olszanecki R., Korbut R. Endotoxaemia in rats: role of leukocyte sequestration in rapid pulmonary nitric oxide synthase-2 expression. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*. 2005; 56(2): 299–311.
111. Hassa P.O., Hottiger M.O. The functional role of poly(adp-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of nf-kappab in inflammatory disorders. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2002; 59(9): 1534–1553.
112. Szabó C., Virág L., Cuzzocrea S., Scott G.S., Hake P., O'Connor M.P., Zingarelli B., Salzman A., Kun E. Protection against peroxyntirite-induced fibroblast injury and arthritis development by inhibition of poly(adp-ribose) synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998; 95(7): 3867–3872.
113. Surjana D. G. M. Halliday, D. L. Damian Role of nicotinamide in dna damage, mutagenesis, and dna repair, role of nicotinamide in dna damage, mutagenesis, and dna repair. *Journal of Nucleic Acids, Journal of Nucleic Acids*. 2010; 2010: 157591. doi:10.4061/2010/157591.
114. Kolb H., Burkart V. Nicotinamide in type 1 diabetes. mechanism of action revisited. *Diabetes Care*. 1999; 22 (Suppl 2): B16–20.
115. Chattopadhyay S., Ramanathan M., Das J., Bhattacharya S.K. Animal models in experimental diabetes mellitus. *Indian Journal of Experimental Biology*. 1997;. 35(11): 1141–1145.

116. Ewing J.F., Janero D.R. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal Biochem.* 1995; 232(2): 243-248.
117. Williamson D.H., Lund P., Krebs H. A. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *The Biochemical Journal.* 1967; 103(2): 514–527.
118. Devasagayam T.P.A., Bloor K.K., Ramasarma T. Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics.* 2003; 40(5): 300–308.
119. Omaye S.T., Turnbull J.D., Sauberlich H.E. Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues, and fluids. *Methods in Enzymology.* 1979; 62: 3–11.
120. Pace C.N., Vajdos F., Fee L., Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science: A Publication of the Protein Society.* 1995; 4(11): 2411–2423.
121. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry.* 1976; 72: 248–254.
122. Swann J.D., Acosta D. Failure of gentamicin to elevate cellular malondialdehyde content or increase generation of intracellular reactive oxygen species in primary cultures of renal cortical epithelial cells. *Biochemical Pharmacology.* 1990; 40(7): 1523–1526.
123. Coder D.M. Assessment of cell viability. *Current protocols in cytometry / editorial board, J. Paul Robinson, managing editor ... [et al.].* 2001; Chapter 9: Unit 9.2. doi: 10.1002/0471142956.cy0902s64.
124. Tanigawa Y., Kawamura M., Shimoyama M. Effect of polyamines on adp-ribosylation of nuclear proteins from rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1976; 76(2): 406–412.
125. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature.* 1970; 227(5259): 680–685.

126. Andres M.M., Luszczki J.J. Modified western blot technique in fast detection of heme oxygenase (ho-1/ho-2) in various tissues and organs of experimental animals. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio D: Medicina.* 2004; 59(2): 298–302.
127. Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. Real time quantitative pcr. *Genome Research.* 1996; 6(10): 986–994.
128. Minchenko A.G., Armstead V.E, Opentanova I.L., Lefer A.M. Endothelin-1, endothelin receptors and ecnos gene transcription in vital organs during traumatic shock in rats. *Endothelium: Journal of Endothelial Cell Research.* 1999; 6(4): 303–314.
129. Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.
130. Laemmli U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680 – 685.
131. Trelstad R.L., Catanese V.M., Rubin D.F. Collagen fractionation: separation of native types I, II and III by differential precipitation. *Anal. Biochem.* 1976; 71(1): 114–118.
132. Miller E.J., Rhodes R.K. Preparation and characterization of the different types of collagen. *Method. Enzymol.* 1982; 82: 33–64.
133. Rajan N., Habermehl J., Coté M.F., Doillon C.J., Mantovani D. Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. *Nat. Protoc.* 2006; 1(6): 2753–2758.
134. Руководство по клинической лабораторной диагностике /под ред. Меньшикова В.В. – Москва: Медицина, 1982. 576 с.
135. Rathbun W.B., Betlach M.V. Estimation of enzymatically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate. *Anal. Biochem.* 1969; 28(1-3): 436-445
136. Forbes J.M., Cooper M.E. Mechanisms of diabetic complications. *Physiological Reviews.* 2013; 93(1): 137–188.

137. Rosenberg D.E., Jabbour S.A., Goldstein B.J. Insulin resistance, diabetes and cardiovascular risk: approaches to treatment. *Diabetes Obes. Metab.* 2005; 7: 642–653.
138. Molteni R., Fabbri M., Bender J.R., Pardi R. Pathophysiology of leukocyte–tissue interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2006; 18: 491–498.
139. Abe I., Shirato K., Hashizume Y., Mitsuhashi R., Kobayashi A., Shiono C., Sato S., Tachiyashiki K., Imaizumi K. Folate-deficiency induced cell-specific changes in the distribution of lymphocytes and granulocytes in rats. *Environmental Health and Preventive Medicine.* 2013; 18(1): 78–84. doi: 10.1007/s12199-012-0286-6.
140. Bertoni A.G., Saydah S., Brancati F.L. Diabetes and the risk of infection-related mortality in the U.S. *Diabetes Care.* 2001; 24: 1044–1049. doi: 10.2337/diacare.24.6.1044.
141. Merzouk S., Hichami A., Sari A., Madani S., Merzouk H., Berrouiguet A.Y., Lenoir-Rousseaux J.J., Chabane-Sari N., Khan N.A. Impaired oxidant/antioxidant status and ldl-fatty acid composition are associated with increased susceptibility to peroxidation of ldl in diabetic patients. *General physiology and biophysics.* 2004; 23(4): 387–399.
142. Bonnefont-Rousselot D., Bastard J.P., Jaudon M.C., Delattre J. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes & metabolism.* 2000; 26(3): 163–176.
143. Otton R., Soriano F.G., Verlengia R., Curi R. Diabetes induces apoptosis in lymphocytes. *The Journal of endocrinology.* 2004; 182(1): 145–156. doi: 10.1677/joe.0.1820145
144. Cuzzocrea S. Shock, inflammation and parp. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society.* 2005; 52(1): 72–82. doi: 10.1016/j.phrs.2005.02.016.
145. Evgenov O.V., Liaudet L. Role of nitrosative stress and activation of poly(adp-ribose) polymerase-1 in cardiovascular failure associated with septic

- and hemorrhagic shock. *Current vascular pharmacology*. 2005; 3(3): 293–299. doi: 10.2174/1570161054368580.
146. Virág L. Structure and function of poly(adp-ribose) polymerase-1: role in oxidative stress-related pathologies. *Current vascular pharmacology*. 2005; 3(3): 209–214.
147. Ungerstedt J.S., Blömbäck M., Söderström T. Nicotinamide is a potent inhibitor of proinflammatory cytokines. *Clinical and experimental immunology*. 2003; 131(1): 48–52. doi: 10.1046/j.1365-2249.2003.02031.x
148. Luo J., Nikolaev A.Y., Imai S., Chen D., Su F., Shiloh A., Guarente L., Gu W. Negative control of p53 by sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*. 2001; 107(2): 137–148. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00524-4.
149. Chong Z.Z., Lin S.H., Li F., Maiese K. The sirtuin inhibitor nicotinamide enhances neuronal cell survival during acute anoxic injury through akt, bad, parp, and mitochondrial associated “anti-apoptotic” pathways. *Current neurovascular research*. 2005; 2(4): 271–285. doi: 10.2174/156720205774322584.
150. Southan G.J., Szabó C. Poly(adp-ribose) polymerase inhibitors. *Current medicinal chemistry*. 2003; 10(4): 321–340. doi: 10.2174/0929867033368376.
151. Li F., Drel V.R, Szabó C., Stevens M.J., Obrosova I.G. Low-dose poly(adp-ribose) polymerase inhibitor-containing combination therapies reverse early peripheral diabetic neuropathy. *Diabetes*. 2005; 54(5): 1514–1522. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.5.1514>
152. Costa P.Z., Soares R. Neovascularization in diabetes and its complications. unraveling the angiogenic paradox. *Life sciences*. 2013; 92(22): 1037–1045. doi: 10.1016/j.lfs.2013.04.001.
153. Rajesh M., Mukhopadhyay P., Godlewski G., Bátkai S., Haskó G., Liaudet L., Pacher P. Poly(adp-ribose)polymerase inhibition decreases angiogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006; 350(4): 1056–1062. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.09.160

154. Dedon P.C., Tannenbaum S.R. Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2004; 423(1): 12–22.
155. Korhonen R., Lahti A., Kankaanranta H., Moilanen E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Current drug targets. Inflammation and allergy*. 2005; 4(4): 471–479. doi: 10.2174/1568010054526359.
156. Young L.H., Ikeda Y., Lefer A.M. Protein kinase inhibition exerts cardioprotective effects in myocardial ischemia/reperfusion via inhibition of superoxide release. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*. 2001; 23(3): 107–114.
157. Дякун К. О., Кучмеровська Т. М., Пентек Ю. Т., Донченко Г. В., Яніцька Л. В., Гузик М. М. Окислювальний стрес у серці щурів при експериментальному цукровому діабеті: ефект нікотинаміду. *Доповіді НАН України*. 2013; 8: 176-181.
158. Li C., Lv L., Li H., Yu D. Cardiac fibrosis and dysfunction in experimental diabetic cardiomyopathy are ameliorated by alpha-lipoic acid. *Cardiovascular Diabetology*. 2012; 11: 73.
159. Greenberg A.S., McDaniel M.L. Identifying the links between obesity, insulin resistance and beta-cell function: potential role of adipocyte-derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes. *European Journal of Clinical Investigation*. 2002; 32(Suppl 3): 24–34.
160. Dinarello C.A. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000; 118(2): 503–508. doi: 10.1378/chest.118.2.503.
161. Opal S.M., DePalo V.A. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 2000; 117(4): 1162–1172. doi: 10.1378/chest.117.4.1162.
162. Briscoe J., Kohlhuber F., Müller M. Jaks and stats branch out. *Trends in Cell Biology*. 1996; 6(9): 336–340. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(96\)10028-3](https://doi.org/10.1016/0962-8924(96)10028-3)
163. Snop M., Welsh N., Jonas J.C., Jörns A., Lenzen S., Eizirik D.L. Mechanisms of pancreatic β -cell death in type 1 and type 2 diabetes many

- differences, few similarities. *Diabetes*. 2005; 54(suppl 2): S97–S107. doi: 10.2337/diabetes.54.suppl_2.s97.
164. Hosseini A., Abdollahi M. Diabetic neuropathy and oxidative stress: therapeutic perspectives. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2013; 2013:168039. doi: 10.1155/2013/168039. Epub 2013 Apr 24.
165. Stavniichuk R.V., Kuchmerovs'ka T. M. Diabetic neuropathy. The role of 12/15 lipoxygenase and metabolism of arachidonic acid. *Endokrinologiya*. 2014; 19(2): 156-166.
166. Guzyk M.M., Dyakun K.O., Yanits'ka L.V., Kuchmerovs'ka T.M. Effects of inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase on some indices of oxidative stress in leucocytes of the rat blood at experimental diabetes mellitus. *Ukr. Biokhim. Zh*. 2013; 85(1): 62-70.
167. Sytze V.D.P., Cotter M.A., Bravenboer B., Cameron N.E. Pathogenesis of diabetic neuropathy: Focus on neurovascular mechanisms. *Eur. J. Pharmacol*. 2013 Nov 5; 719(1-3): 180-186. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.07.017. Epub 2013 Jul 17.
168. Stavniichuk R.V., Obrosova A.A., Drel V.R., Nadler J.L., Obrosova I.G., A. Yorek M.A. 12/15-Lipoxygenase inhibition counteracts MAPK phosphorylation in mouse and cell culture models of diabetic peripheral neuropathy. *J. Diabetes Mellitus*. 2013 Aug; 3(3): 10.4236/jdm.2013.33015. doi: 10.4236/jdm.2013.33015
169. Guzyk M.M., Dyakun K.O., Yanits'ka L.V., Kuchmerovs'ka T.M. Effects of inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase on some indices of oxidative stress in leucocytes of the rat blood at experimental diabetes mellitus. *Ukr. Biokhim. Zh*. 2013; 85(1): 62-70.
170. Obrosova I.G., Li F., Abatan O.I., Forsell M.A., Komjáti K., Pacher P., Szabó C., Stevens M.J. Role of poly(adp-ribose) polymerase activation in diabetic neuropathy. *Diabetes*. 2004 Mar; 53(3): 711–720. doi: 10.2337/diabetes.53.3.711.

171. Pacher P., Szabó C. Role of poly(adp-ribose) polymerase-1 activation in the pathogenesis of diabetic complications: endothelial dysfunction, as a common underlying theme. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2005 Nov-Dec;. 7(11-12): 1568–1580. doi: 10.1089/ars.2005.7.1568.
172. Satoh A., Brace C.S., Ben-Josef G., West T., Wozniak D.F., Holtzman D.M., Herzog E.D., Imai S.I. Sirt1 promotes the central adaptive response to diet restriction through activation of the dorsomedial and lateral nuclei of the hypothalamus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2010 Jul; 30(30): 10220–10232. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1385-10.2010
173. Nieto N., Friedman S.L., Cederbaum A.I. Cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species mediate paracrine stimulation of collagen I protein synthesis by hepatic stellate cells. *J. Biol. Chem*. 2002 Mar 22; 277(12): 9853–9864. doi: 10.1074/jbc.M110506200.
174. Lehti T. M., Silvennoinen M., Kivela R., Kainulainen H., Komulainen J. Effects of streptozotocin-induced diabetes and physical training on gene expression of titin-based stretchsensing complexes in mouse striated muscle // *Am. J. Physiol. Endocr. Metab*. 2007 Feb; 292(2): E533–542. doi: 10.1152/ajpendo.00229.2006.
175. Hamilton E.J., Rakic V., Davis W.A., Chubb S.A.P., Kamber N., Prince R. L., Davis T.M.E. Prevalence and predictors of osteopenia and osteoporosis in adults with Type 1 diabetes. *Diab. Med*. 2009; 26(1): 45–52. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2008.02608.x>
176. Gass R. The early preclinical diagnosis of osteoporosis measuring the pure trabecular bone density. *Eur. J. Med. Res*. 2001; 6(5): 228–230.
177. Thrailkill K.M., Lumpkin C.K., Bunn R.C., Kemp S.F., Fowlkes J.L. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 2005; 289(5): 735–745. doi: 10.1152/ajpendo.00159.2005.

178. Rossert J., Terraz C., Dupont S. Regulation of type I collagen genes expression. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000; 15 Suppl 6: 66–68. doi: 10.1093/ndt/15.suppl_6.66.
179. Saito M. Poor bone quality in diabetes: detrimental collagen cross-link pattern reduces bone strength without change in bone mineral density. *Clinical Calcium.* 2006 Aug; 16(8): 1287–1295.
180. Naidu K.A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr. J.* 2003 Aug; 2: 7. doi: 10.1186/1475-2891-2-7.
181. Arjmandi B., Juma S., Beharka A., Bapna M., Akhter M., Meydani S. Vitamin E improves bone quality in the aged but not in young adult male mice. *J. Nutr. Biochem.* 2002 Sep; 13(9): 543–549. doi: 10.1016/s0955-2863(02)00199-7.
182. Smith B.J., Lucas E.A., Turner R.T., Evans G.L., Lerner M.R., Brackett D.J., Stoecker B.J., Arjmandi B.H. Vitamin E provides protection for bone in mature hindlimb unloaded male rats. *Calcif. Tissue Int.* 2005 Apr; 76(4): 272–279. doi: 10.1007/s00223-004-0269-8.
183. Kolb H., Burkart V. Nicotinamide in type 1 diabetes. Mechanism of action revisited. *Diabetes Care.* 1999 Mar; 22 Suppl 2: 16–20.
184. Vaca P., Berná G., Araujo R., Carneiro E.M., Bedoya F.J., Soria B., Martín F. Nicotinamide induces differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells. *Exp. Cell Res.* 2008 Mar; 314(5): 969-974. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.11.019.
185. Stinson R.A., Hamilton B.A. Human liver plasma membranes contain an enzyme activity that removes membrane anchor from alkaline phosphatase and converts it to a plasma-like form. *Clin. Biochem.* 1994; 27(1): 49–55. doi: 10.1016/0009-9120(94)90011-6.
186. Seibel M.J. Biochemical markers of bone turnover: part 1: biochemistry and variability. *Clin. Biochem. Rev.* 2005 Nov; 26(4): 97–122.

187. Golub E.E., Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr. Opin. Orthop.* 2007; 18(5): 444–448. doi: 10.1097/BCO.0b013e3282630851
188. Kim B.M., Eichler J., Reiser K.M., Rubenchik A.M., Da Silva L.B. Collagen structure and nonlinear susceptibility: effects of heat, glycation, and enzymatic cleavage on second harmonic signal intensity. *Lasers Surg. Med.* 2000; 27(4): 329–335. doi: 10.1002/1096-9101(2000)27:4<329::aid-lsm5>3.0.co;2-c.
189. Yavuz D., Tuğtepe H., Cetinel S., Uyar S., Kaya H., Haklar G., Civelek S., Deyneli O., San T., Burçak G., Akalin S. Collagen ultrastructure and TGF-beta1 expression preserved with aminoguanidine during wound healing in diabetic rats. *Endocr. Res.* 2005; 31(3): 229–243. doi: 10.1080/07435800500373140.
190. Saito M., Marumo K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporis Int.* 2010 Feb; 21(2): 195–214. doi: 10.1007/s00198-009-1066-z.
191. Saito M. Poor bone quality in diabetes: detrimental collagen cross-link pattern reduces bone strength without change in bone mineral density. *Clinical Calcium.* 2006 Aug; 16(8): 1287–1295.
192. Loeser R. F., Wallin R. Cell adhesion to matrix Gla protein and its inhibition by an Arg-Gly- Asp-containing peptide. *J. Biol.Chem.* 1992 May; 267(14): 9459–9462.
193. Koide T., Takahara Y., Asada S., Nagata K. Xaa-Arg-Gly triplets in the collagen triple helix are dominant binding sites for the molecular chaperone HSP47. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(8): 6178–6182. doi: 10.1074/jbc.M106497200.
194. Reddy G. K. Cross-linking in collagen by nonenzymatic glycation increases the matrix stiffness in rabbit achilles tendon. *Exp. Diabetes Res.* 2004; 5(2): 143–153. doi: 10.1080/15438600490277860.

195. Santana R. B., Xu L., Chase H. B., Amar S., Graves D. T., Trackman P. C. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2003; 52(6): 1502–1510.
196. He H., Liu R., Desta T., Leone C., Gerstenfeld L. C., Graves D. T. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinology*. 2004; 145(1): 447–452.
197. Al-Mashat H. A., Kandru S., Liu R., Behl Y., Desta T., Graves D. T. Diabetes enhances mRNA levels of proapoptotic genes and caspase activity, which contribute to impaired healing. *Diabetes*. 2006; 55(2): 487–495.
198. Avery N. C., Bailey A. J. The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen. *Pathol. Biol*. 2006; 54(7): 387–395. doi: 10.1016/j.patbio.2006.07.005.
199. Blades H. Z., Arundel P., Carlino W. A., Dalton A., Crook J. S., Freeman J. V., Bishop N. J. Collagen gene polymorphisms influence fracture risk and bone mass acquisition during childhood and adolescent growth. *Bone*. 2010; 47(5): 989–994. doi: 10.1016/j.bone.2010.08.014.
200. Wirtz M. K., Rao V. H., Glanville R. W., Labhard M. E., Pretorius P. J., de Vries W. N., de Wet W. J., Hollister D. W. A cysteine for glycine substitution at position 175 in an alpha 1 (I) chain of type I collagen produces a clinically heterogeneous form of osteogenesis imperfecta. *Connect. Tissue Res*. 1993; 29(1): 1–11.
201. Ishikawa S., Iwasaki K., Komaki M., Ishikawa I. Role of ascorbic acid in periodontal ligament cell differentiation. *J. Periodontol*. 2004; 75(5): 709–716. doi: 10.1902/jop.2004.75.5.709.
202. Dozin B., Quarto R., Campanile G., Cancedda R. In vitro differentiation of mouse embryo chondrocytes: requirement for ascorbic acid. *Eur. J. Cell Biol*. 1992; 58(2): 390–394.
203. Blumberg P., Brenner R., Budny S., Kresse H. Increased turnover of small proteoglycans synthesized by human osteoblasts during cultivation with

- ascorbate and betaglycerophosphate. *Calcified Tissue Int.* 1997; 60(6): 554–560.
204. Sullivan T. A., Uschmann B., Hough R., Leboy P. S. Ascorbate modulation of chondrocyte gene expression is independent of its role in collagen secretion. *J. Biol. Chem.* 1994; 269(36): 22500–22506.
205. Otsuka E., Yamaguchi A., Hirose S., Hagiwara H. Characterization of osteoblastic differentiation of stromal cell line ST2 that is induced by ascorbic acid. *Am. J. Physiol.* 1999; 277: 132–138.
206. Franceschi R. T. Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells. *J. Bone Miner. Res.* 1994; 9(6): 843–854.
207. Kuchmerovska T., Shymanskyi I., Donchenko G., Kuchmerovskyy M., Pakirbaieva L., Klimenko A. Poly(ADP-ribosyl)ation enhancement in brain cell nuclei is associated with diabetic neuropathy. *J. Diabetes Complicat.* 2004; 18(4): 198–204.
208. Kuchmerovska T., Shymanskyi I., Chlopicki S., Klimenko A. 1-methylnicotinamide (MNA) in prevention of diabetes-associated brain disorders. *Neurochem. Int.* 2010; 56(2): 221–228.
209. Bolander F. F. Vitamins: not just for enzymes. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 2006; 7(10): 912–915.
210. Sallie R., Tredger J. M., Williams R. Drugs and the liver. Part 1: Testing liver function. *Biopharm. Drug Dispos.* 1991; 12(4): 251–259.
211. Marí M., Cederbaum A. I. Induction of catalase, alpha, and microsomal glutathione S-transferase in CYP2E1 overexpressing HepG2 cells and protection against short-term oxidative stress. *Hepatology.* 2001; 33(3): 652–661. doi: 10.1053/jhep.2001.22521.
212. Шупрович А.А., Гуріна Н.М., Корпачева-Зінич О.В. Порухення обміну сечової кислоти у щурів з експериментальним інсулінорезистентним синдромом, індукованим фруктозою. *Фізіол. журн.* 2011; 57(1): 72-81.

213. Донченко Г.В. Биохимия убихинина (Q). – К.: Наукова думка, 1988. – 240 с.
214. Cai D, Liu T. Inflammatory cause of metabolic syndrome via brain stress and NF- κ B. *Aging*. 2012; 4(2): 98–115. doi: 10.18632/aging.100431.
215. Li H, Horke S, Förstermann U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2013; 34(6): 313–319. doi: 10.1016/j.tips.2013.03.007.
216. Alam S.I., Rehman S.U., Kim M.O. Nicotinamide Improves Functional Recovery via Regulation of the RAGE/JNK/NF- κ B Signaling Pathway after Brain Injury. *J Clin Med*. 2019; 8(2): 271. <https://doi.org/10.3390/jcm8020271>.
217. 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. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу опубліковані в журналі “Медична та клінічна хімія”. (Тернопіль, 30 вересня - 4 жовтня, 2019). Україна, 2019. Т.21, 30(80): 242.
218. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas - 8th edition: key messages. IDF <https://diabetesatlas.org/key-messages.html> - 2019.
219. Pop-Busui R., Boulton A.J.M., Feldman E.L., Bril V., Freeman R., Malik R.A., Sosenko J.M., Ziegler D. Diabetic neuropathy: a position statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2017; 40: 136–154.
220. Akamine T., Kusunose N., Matsunaga N., Koyanagi S., Ohdo S. Accumulation of sorbitol in the sciatic nerve modulates circadian properties of diabetes-induced neuropathic pain hypersensitivity in a diabetic mouse model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018; 503(1): 181–187. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.05.209.
221. Kuchmerovska T.M., Tykhonenko T.M., Tykhomyrov A.O., Guzyk M.M. New insights in nicotinamide and nicotinoyl-GABA action on diabetes-associated nervous system disorders. Materials of XII Ukrainian biochemical

- congress. Published in journal “Medical and Clinical chemistry” (Ternopil, 30 September – 4 October, 2019). Ukraine, 2019. T. 21, 3(80): 202-203.
222. Bommer C., Heesemann E., Sagalova V., Manne-Goehler J., Atun R., Bärnighausen T., Vollmer S. The global economic burden of diabetes in adults aged 20–79 years: a cost-of-illness study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2017; 5(6): 423–430. doi: 10.1016/S2213-8587(17)30097-9.
223. Vadiveloo T., Jeffcoate W., Donnan P.T., Colhoun H.C., McGurnaghan S., Wild S., McCrimmon R., Leese G.L. Amputation-free survival in 17,353 people at high risk for foot ulceration in diabetes: a national observational study. *Diabetologia*. 2018; 61: 2590–2597. doi: 10.1007/s00125-018-4723-y.
224. Kioskli K., Scott W., Winkley K., Kylakos S., McCracken L.M. Psychosocial factors in painful diabetic neuropathy: a systematic review of treatment trials and survey studies. *Pain Med*. 2011; 20: 1756–1773. doi: 10.1093/pm/pnz071.
225. Nagai A., Matsumiya H., Hayashi M., Yasui S., Okamoto H., Konno K. Effects of nicotinamide and niacin on bleomycin-induced acute injury and subsequent fibrosis in hamster lungs. *Exp. Lung Res*. 1994; 20: 263–281. doi: 10.3109/01902149409064387.
226. Zheng C., Yin Q., Wu H. Structural studies of NF- κ B signaling. *Cell Res*. – 2011; 21(1): 183–195.
227. Hassa P.O., Haenni S.S., Buerki C., Meier N.I., Lane W.S., Owen H., Gersbach M., Imhof R., Hottiger M.O. Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF- κ B-dependent transcription. *J Biol Chem*. 2005; 280(49): 40450–40464. doi: 10.1074/jbc.M507553200.
228. Olszanecki R., Gebaska A., Jawień J., Jakubowski A., Korbut R. Inhibition of NOS-2 induction in lps-stimulated j774.2 cells by 1,5-isoquinolinediol, an inhibitor of PARP. *J. Physiol. Pharmacol*. 2006; 57(1): 109–117.
229. Lin Y., Tang X., Zhu Y., Shu T., Han X. Identification of PARP-1 as one of the transcription factors binding to the repressor element in the promoter

- region of COX-2. *Arch. Biochem. Biophys.* 2011; 505(1): 123–129. doi: 10.1016/j.abb.2010.09.016.
230. Laudisi F., Sambucci M., Pioli C. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) as immune regulator. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets.* 2011 Dec; 11(4): 326-333. doi: 10.2174/187153011797881184.
231. Hwang J.W., Chung S., Sundar I.K., Yao H. Cigarette smoke-induced autophagy is regulated by SIRT1-PARP-1-dependent mechanism: Implication in pathogenesis of COPD. *Arch. Biochem. Biophys.* 2010; 500(2): 203–209. doi: 10.1016/j.ypped.2011.11.014
232. Kolthur-Seetharam U., Dantzer F., McBurney M. W., Murcia G., Sassone-Corsi P. Control of AIF-mediated cell death by the functional interplay of SIRT1 and PARP-1 in response to DNA damage. *Cell Cycle.* 2006; 5(8): 873–877. doi: 10.4161/cc.5.8.2690.
233. Zhang T., Kraus W. L. SIRT1-dependent Regulation of Chromatin and Transcription: Linking NAD⁺ Metabolism and Signaling to the Control of Cellular Functions. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010; 1804(8): 1666–1675. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.10.022.
234. Hwang E.S., Song S.B. Possible Adverse Effects of High-Dose Nicotinamide: Mechanisms and Safety Assessment. *Biomolecules.* 2020; 10(5): 687. doi: 10.3390/biom10050687.
235. Dong Y.J., Liu N., Xiao Z., Sun T., Wu S.H., Sun W.X., Xu Z.G., Yuan H. Renal protective effect of sirtuin 1. *J. Diabetes Res.* 2014; 2014: 843786. <https://doi.org/10.1155/2014/843786>
236. Clark J.B., Ferris J.M., Pinder S. Inhibition of nuclear NAD nucleosidase and poly ADP-ribose polymerase activity from rat liver by nicotinamide and 5'-methyl nicotinamide. *Biochem. Biophys. Acta.* 1971; 238(1): 82-85. doi: 10.1016/0005-2787(71)90012-8.
237. Cepeda V., Fuertes M.A., Castilla J., Alonso C., Quevedo C., Soto M., Pérez J.M. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors in cancer

- chemotherapy. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* 2006; 1(1): 39-53. doi: 10.2174/157489206775246430.
238. Southan G.J., Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 2003; 10: 321-340. doi: 10.2174/0929867033368376.
239. Steffen J.D., Brody J.R., Armen R.S., Pascal J.M. Structural implications for selective targeting of PARPs. *Front. Oncol.* 2013; 3: 14. doi: 10.3389/fonc.2013.00301.
240. Curtin N.J. PARP inhibitors for cancer therapy. *Expert Rev. Mol. Med.* 2005; 7(4): 1-20. doi: 10.1017/S146239940500904X.
241. Suto M.J., Turner W.R., Arundel-Suto C.M., Werbel L.M., Sebolt-Leopold J.S. Dihydroisoquinolinones: the design and synthesis of a new series of potent inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Anticancer Drug Des.* 1991; 6(2): 107-117.
242. Calabrese C.R., Batey M.A., Thomas H.D., Durkacz B.W., Wang L.Z., Kyle S., Skalitzky D., Li J., Zhang C., Boritzki T., Maegley K., Calvert A.H., Hostomsky Z., Newell D.R., Curtin N.J. Identification of potent nontoxic poly(ADP-Ribose) polymerase-1 inhibitors: chemopotential and pharmacological studies. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9(7): 2711-2718.
243. Murai J., Pommier Y. Classification of PARP Inhibitors Based on PARP Trapping and Catalytic Inhibition, and Rationale for Combinations with Topoisomerase I Inhibitors and Alkylating Agents, Chapter from book *PARP Inhibitors for Cancer Therapy*. 2015: 261-274.
244. Xiong Y., Guo Y., Liu Y., Wang H., Gong W., Liu Y., Wang X., Gao Y., et al. Pamiparib is a potent and selective PARP inhibitor with unique potential for the treatment of brain tumor. *Neoplasia.* 2020; 22(9): 431-440. doi: 10.1016/j.neo.2020.06.009

ДОДАТОК 1

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Гузик М.М., Дякун К.О., Яніцька Л.В., Кучмеровська Т.М. Вплив інгібіторів полі(ADP-рибозо)полімерази на деякі показники оксидативного стресу в лейкоцитах крові за стрептозотоцинового діабету у щурів. Український біохімічний журнал. 2013; 85(1):62-70.
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.
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.
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.
5. Тихоненко Т., Дякун К., Сергійчук Ю. Мітохондріальна дегідрогеназна активність нервових закінчень мозку щурів. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2016; 73:203-207.
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.

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.
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 Brain of Diabetic. Neurophysiology – 2019. – 51, No 4, P. 234-247.
9. Dyakun K., Kuchmerovska T., Guzyk M., Yanytska 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. (Oral presentations).
10. Pentek 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(ADP-рибозо)полімерази. Матеріали науково-практичної конференції «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології». Дванадцяті Данилевські читання 14-15 березня 2013, Харків, С. 77 – 78 (усна доповідь).

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 (усна доповідь.)
13. Пентек Ю. Т., Ставнічук 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-робозо)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. (усна доповідь)
16. Kuchmerovska Tamara, Sergiichuk Iuliia, Guzyk Mykhailo, Dyakun Kateryna, Tychonenko 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. (Poster)
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. Друк
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 impact of nicotinamide (NAm) on the key brain functional targets in prevention of diabetic neuropathy. 32nd ECNP Congress Copenhagen, Denmark 7-10 Sept, 2019.
21. Yanitska L.V., Tykhonenko T.M., Guzyk, K. Dyakun, Pryvrotska I.B., 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 (додаток) 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 (додаток) 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.

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» (Харків, 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).