

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМЕНІ О. В. ПАЛЛАДИНА**

На правах рукопису

ТИХОНЕНКО ТЕТЯНА МИХАЙЛІВНА

УДК 577.151.6:577.164.3:612.04:616.8:612.349.7

**МЕХАНІЗМИ РЕАЛІЗАЦІЇ ДІЇ ВІТАМІНУ В₃
ТА ЙОГО ПОХІДНИХ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО
ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ**

03.00.04 – біохімія

Біологія

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
_____ Тихоненко Т.М.

Науковий керівник:
доктор біологічних наук, професор
Кучмеровська Тамара Муратівна

КИЇВ – 2020

АНОТАЦІЯ

Тихоненко Т.М. – “Механізми реалізації дії вітаміну В₃ та його похідних за експериментального цукрового діабету.”

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.04 “Біохімія” – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2020.

Вітамін В₃ та його біологічно активні похідні відіграють важливу роль у багатьох біохімічних функціях людського організму. Вітамін В₃ є попередником біосинтезу нікотинамідаденіндинуклеотидів (NAD) та нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату (NADP), обидва з яких є коензимами для численних метаболічних ензимів. NAD є ключовим коензимом у синтезі аденозинтрифосфату (АТФ), а також субстратом таких ензимів як полі-(ADP-рибозо)-полімерази (PARP), NAD-залежних деацетилаз (сіртуїнів) та циклічних ADP-рибоз (сADPR), CD38 і CD157. Перебіг численних метаболічних процесів залежить від NAD, NADH або їх співвідношення, яке відіграє важливу регуляторну роль за метаболічних порушень, пов'язаних з віком, нейродегенеративними захворюваннями, психічними розладами тощо. Біологічно активне похідне вітаміну В₃ - нікотиноіл-гамма-аміномасляна кислота (N-GABA) –це кон'югат гамма-аміномасляної та нікотинової кислот, який поєднує в основному властивості цих двох компонентів. Він швидше, ніж нікотинат, всмоктується у кров і, на відміну від ГАМК, легко долає гематоенцефалічний бар'єр, беручи участь у функціонуванні головного мозку. ГАМК є головним гальмівним нейромедіатором в центральній нервовій системі, а також проявляє функціональну активність в інших периферичних тканинах.

Попри наявність значної кількості даних літератури стосовно ролі вітаміну В₃ та його похідних у лікуванні пацієнтів із цукровим діабетом (ЦД) залишається актуальним з'ясування механізмів дії NAm та N-GABA на тлі порушень, які виникають за цього захворювання. Метою дисертаційної

роботи було дослідити молекулярні механізми дії вітаміну B₃ та його біоактивних похідних за експериментального цукрового діабету 1 типу.

Дослідження були проведені на експериментальній моделі цукрового діабету 1 типу та клітинних лініях RINm5f, EA.hy926. Для досягнення мети було поставлено ряд завдань: 1) З'ясувати, чи володіють NAm та N-GABA протизапальною, антиоксидантною та гіпоглікемічною дією за ЦД 1 типу; 2) Оцінити дію NAm та N-GABA на метаболічні та структурні зміни у сідничному нерві, індуковані ЦД 1 типу; 3) Охарактеризувати стан поліолового шляху обміну глюкози у мозку діабетичних щурів та за введення тваринам NAm та N-GABA; 4) Оцінити вміст протеїнів: транскрипційного фактору κB (NF-κB), проапоптичного протеїну BAX, нейрональної NO-синтази (nNOS), фактору росту ендотелійних клітин судин (VEGF) у тканині головного мозку щурів за ЦД 1 типу та його корекції; 5) Визначити вміст гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP), триплету протеїнів нейрофіламентів (NF), протеїну віментину, основного протеїну мієліну (MBP) у тканині головного мозку щурів за ЦД 1 типу та за дії NAm та N-GABA.

Було встановлено, що NAm не впливав на рівень глюкози крові, проте N-GABA проявляв незначну гіпоглікемічну дію.

Порушення метаболізму глюкози (гіперглікемія) в організмі також призводить до дисфункцій острівців Лангергарса, що супроводжується втратою β-клітин і зниженням секреції інсуліну. При цьому було виявлено, що NAm запобігає розвитку функціональних та структурних змін підшлункової залози за цукрового діабету 1 типу. Дослідження проведені *in vitro* на культурі клітин RIN-m5F також продемонстрували, що висока концентрація глюкози (100 ммоль/л) призводила до зниження життєздатності клітин, розвитку оксидативного стресу та зниження рівня мембранного потенціалу мітохондрій цих клітин. При цьому внесення у середовище інкубації NAm у концентрації 1 ммоль/л запобігало

дисфункціям клітин, що може бути результатом його специфічної дії, як попередника синтезу NAD.

У даній роботі було показано, що застосування NAm або N-GABA призводило до підвищення життєздатності лейкоцитів крові, зниження рівня активних форм кисню, відновлення перерозподілу основних типів лейкоцитів та зниження рівня мітохондрійного мембранного потенціалу, що може пригнічувати розвиток запальних процесів за ЦД 1 типу.

Проведені дослідження на ендотелійних клітинах EA.hy926 показали, що за дії високої концентрації глюкози відбуваються морфологічні зміни у клітинах та зниження мембранного потенціалу мітохондрій. Було виявлено, що NAm запобігає дисфункціям у досліджуваних клітинах.

Серед багатьох патогенетичних процесів, які виникають за діабетичних нейропатій значне місце належить активації поліолового шляху обміну глюкози в багатьох тканинах, що призводить до структурних та функціональних змін. Результати проведених досліджень показали, що за ЦД відбувається накопичення сорбітолу в сідничному нерві та зміни його структури, що супроводжується частковою демієлінізацією та фрагментацією нервових волокон, набряком волокон та зменшенням його товщини. Застосування NAm або N-GABA пригнічувало активацію поліолового шляху обміну глюкози, а також частково запобігало структурним змінам у сідничному нерві діабетичних тварин.

Суттєве підвищення вмісту сорбітолу також було виявлено у цільному мозку щурів, так і в його окремих відділах, що є доказом розвитку діабетичної енцефалопатії. Введення NAm діабетичним щурам призводило до зниження вмісту сорбітолу у цільному мозку, а також у всіх досліджуваних його відділах, причому найбільш виражено у гіпокампі та мозочку.

Для з'ясування коригувальної ролі досліджуваних сполук у дисфункціях мозку за ЦД було оцінено вміст ключових протеїнів, які відіграють важливу роль у багатьох нейродегенеративних захворюваннях.

Нами була виявлено підвищення вмісту протеїну регуляторного транскрипційного фактору NF- κ B у мозку за ЦД, що може індукувати зміни експресії генів, протеїни яких будуть посилювати запалення і оксидативний стрес (ОС), викликати апоптоз, що, в свою чергу, може призводити до індукованої оксидативним стресом клітинної дисфункції та навіть загибелі клітин. Було показано, що за хронічного введення NAm діабетичним щурам відбувалося незначне зниження вмісту NF- κ B, тоді як вміст NF- κ B більш виражено знижувався при використанні N-GABA. Крім того, оксидативний стрес, індукований гіперглікемією, викликає BAX-асоційовані події, що може призводити до активації каспази і загибелі клітин шляхом апоптозу. Отримані результати показали, що вміст протеїну BAX в діабетичній групі підвищувався порівняно з контрольною групою. Така надекспресія проапоптичного протеїну BAX може призводити до мітохондрійної дисфункції і навіть до загибелі клітин. Хронічне введення NAm або N-GABA призводило до зниження вмісту BAX, при чому N-GABA мав більш виражений ефект. Цереброваскулярна дисфункція, індукована ЦД, може бути також пов'язана зі зміною вазодилататорних шляхів, які підтримують мозковий кровотік за фізіологічних умов. Було показано, що у мозку діабетичних щурів вміст протеїну nNOS знижувався, в той час як за впливу NAm або N-GABA вміст nNOS підвищувався. Ключовим регулятором множинних аспектів структури і функції кровоносних судин є фактор росту ендотелійних клітин судин (VEGF). Отримані дані дозволили виявити, що вміст протеїну VEGF у мозку діабетичних щурів знижувався порівняно з контрольною групою, і нормалізувався при застосуванні NAm та N-GABA, що свідчить про принаймні часткову нормалізацію ангіогенної відповіді, дія N-GABA була більш вираженою.

Було показано, що цукровий діабет також супроводжувався розвитком реактивного гліозу, про що свідчить підвищення вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) та продуктів його деградації. Застосування NAm не призводило до зниження вмісту GFAP в мозку

діабетичних щурів. Однак, N-GABA призводив до підвищення вмісту цього протеїну порівняно з діабетичною групою тварин. Оскільки за введення N-GABA також було виявлено підвищення вмісту віментину, який є важливим цитоскелетним структурним протеїном і характерний для попередників астроцитів або проліферуючих астроцитів, які є імунореактивними для GFAP та віментину, це може вказувати на проліферацію астроцитів та захисну реакцію мозку від можливого пошкодження клітин і метаболічних дисфункцій, індукованих діабетом. Отримані дані продемонстрували, що вміст віментину в мозку у групі діабетичних тварин та у групі діабетичних тварин, яким водили NAm порівняно з контролем не змінювався. При дослідженні вмісту трьох субодиниць протеїнів нейрофіламентів за ЦД були виявлені зміни у їх синтезі: підвищення вмісту протеїнів нейрофіламентів середньої щільності (NF-M) та зниження вмісту протеїнів нейрофіламентів низької (NF-L) та високої щільності (NF-H). При цьому більш вираженим нормалізуючим ефектом володів NAm для протеїнів NF-L та NF-H.

Крім цього, за патологічних умов нами були виявлені порушення у мієліновій оболонці. Було продемонстровано зниження вмісту основного протеїну мієліну (MBP) за ЦД, при цьому за введення NAm його вміст не мав різниці з діабетичною групою, проте введення N-GABA призводило до незначного підвищення вмісту MBP порівняно з групою діабетичних щурів.

Отримані дані вазують на те, що за ЦД 1 типу відбуваються пошкодження нейронів та функціональні зміни в астрогліальних клітинах мозку, порушення проникності гематоенцефалічного бар'єру, свідченням чого є підвищений вміст GFAP та протеїну NF-L у сироватці крові. Застосування NAm або N-GABA призводило до часткового зниження вмісту GFAP та протеїну NF-L у сироватці крові.

Також були виявлено, що в ядерних екстрактах мозку діабетичних щурів вміст сіртуїну 1 знижувався, вміст сіртуїну 2 підвищувався, при цьому NAm мав коригуючу дію.

На тлі гіперглікемії та метаболічних змін у нирках, що супроводжувалися зниженням вмісту NAD і співвідношення вільних NAD/NADH пар, нами було виявлено підвищення вмісту альбуміну у добовій сечі діабетичних тварин, що свідчить про розвиток мікроальбумінурії. Введення NAm діабетичним щурам призводило до зниження вмісту альбуміну у сечі та підвищення вмісту NAD.

Таким чином, ЦД 1 типу та розвиток його ускладнень супроводжуються суттєвими змінами у крові, підшлунковій залозі, периферичній та центральній нервовій системі, нирках. Отримані результати дозволили встановити, що досліджувані сполуки можуть частково або повністю реалізувати свою дію за цих порушень шляхом пригнічення активації оксидативного стресу, апоптозу, запальних процесів, реактивного гліюзу, демієлінізації нейронів, відновленням функцій судин та окисно-відновного балансу.

Ключові слова: цукровий діабет, нейропатія, гіперглікемія, оксидативний стрес, апоптоз, NAD-залежні процеси, мітохондрії, деацетилювання, полі-ADP-рибозилування, нікотинамід, нікотиноїл-гамма-аміномасляна кислота.

SUMMARY

Tykhonenko T.M. “Mechanisms of the action of vitamin B₃ and its derivatives under experimental diabetes mellitus” - Qualification scientific work, the manuscript.”

Thesis for a candidate degree in biological sciences (Doctor of Philosophy), specialty 03.00.04 "Biochemistry" – O. V. Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2020.

Vitamin B₃ and its biologically active derivatives play an important role in many biochemical functions of the human body. Vitamin B₃ and its biologically active derivatives play an important role in many biochemical functions of the human body. Vitamin B₃ is a precursor to the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate which are the key coenzymes for numerous metabolic enzymes. NAD is coenzyme of adenosine triphosphate synthesis and a substrate for the following enzymes: poly(ADP-ribose)polymerases (PARPs), NAD-dependent deacetylases (Sirtuins) and cyclic ADP-ribosylsynthases(cADPR), CD38 and CD157. The passing of numerous metabolic processes depends on NAD, NADH or their ratio, which plays an important regulatory role in metabolic disorders associated with age, neurodegenerative diseases, mental disorders. Biologically active derivative of vitamin B₃ - nicotinoyl-gamma-aminobutyric acid (N-GABA) is a conjugate of gamma-aminobutyric and nicotinic acids, which combines the basic properties of these two components. It is faster than nicotinate absorbed into the bloodstream and, unlike GABA, easily overcomes the blood-brain barrier, taking part in the functioning of the brain. GABA is the main inhibitory neurotransmitter in the central nervous system, and also shows functional activity in other peripheral tissues.

Despite the presence of a significant data on the role of vitamin B₃ and its derivatives in the diabetes treatment, it remains actual to clarify the mechanisms of action NAm and N-GABA under the dysfunctions that arise from this disease. The aim of the thesis was to research the mechanisms of the action of vitamin B₃

and its derivatives under experimental diabetes mellitus type 1. The studies were performed with using an experimental model of diabetes mellitus and cell lines RINm5f, EA.hy926. To achieve the goal were pointed out the following tasks: 1) to determine whether NAM and N-GABA have anti-inflammatory, antioxidant and hypoglycemic effects under the experimental type 1 diabetes; 2) to evaluate the action of NAM and N-GABA on metabolic and structural changes in the sciatic nerve under type 1 diabetes; 3) to estimate the status of the polyol pathway of glucose metabolism in the brain of animals under diabetes and under the action of NAM and N-GABA; 4) to evaluate the content in the rat brain tissue the following proteins: transcription factor κ B (NF- κ B), proapoptotic protein BAX, neuronal NO synthase (nNOS), vascular endothelial growth factor (VEGF) in type 1 diabetes and under the effects of NAM and N-GABA; 5) to evaluate the content of glial fibrillar acid protein (GFAP), triplet of neurofilaments protein (NF), vimentine and myelin basic protein (MBP) in the rat brain tissue in type 1 diabetes under the effects of NAM and N-GABA.

It was found that NAM treatment did not affect blood glucose, but N-GABA had a slight hypoglycemic effect.

Glucose metabolism disturbance (hyperglycemia) also leads to dysfunctions of Langerhans islets, which is accompanied by the loss of β -cells and decrease of the insulin secretion. It was found that NAM prevented the development of functional and structural changes in the pancreas under type 1 diabetes. We demonstrated that high glucose concentrations (100 mmol/L) resulted in the decrease of cell viability, development of oxidative stress and alteration of the membrane potential in RIN-m5F cell. In this case, NAM treatment (1 mmol / L) prevented cell dysfunctions that could be the result of its specific action as a precursor to the synthesis of NAD.

In this work, it has been shown that the NAM or N-GABA treatment resulted in increase of blood leukocytes viability, inhibition of the development of oxidative stress, prevention of the changes in the redistribution of the major types

of leukocytes and mitochondrial membrane potential changes that may inhibit the development of inflammatory processes under type 1 diabetes.

The obtained results have shown that hyperglycemia can also lead to the endothelial dysfunctions, because we had found the morphological changes in endothelial cells EA.hy926 and the changes in the membrane potential of mitochondria. It has been found that NAM had prevented the dysfunction in these cells.

The polyol pathway of glucose metabolism is one of the many pathogenetic processes related to diabetic neuropathy and lead to structural and functional changes in many tissues. The obtained results showed that the sorbitol accumulation in the sciatic nerves and the changes in their structure accompanied by the partial demyelization and fragmentation of the nerve fibers, edema of the fibers and a decrease of the fiber thickness. NAM or N-GABA treatment inhibited activation of the polyol pathway glucose metabolism and also partially prevented structural changes in the sciatic nerve of the diabetic animals.

A significant increase of the sorbitol level was found in the rat brain and in its regions, which is an evidence of the development of the diabetic encephalopathy. NAM treatment of the diabetic rats led to a decrease the sorbitol level in the whole brain and in all its investigated regions, especially in the hippocampus and the cerebellum.

To find out the role of the studied compounds in the brain dysfunctions under diabetes, we evaluated the level of the key proteins, that play an important role in development of many neurodegenerative diseases. It was shown that the regulatory transcription factor NF- κ B was activated in the brain under diabetes. This can induce the changes in the gene expression of the proteins that will exacerbate inflammation and oxidative stress, cause apoptosis, that can lead to the further cellular dysfunction induced by oxidative stress and even cell death. Treatment with NAM led to a slight decrease in the expression of NF- κ B in the diabetic rat brain, while the expression of NF- κ B decreased more pronouncedly under treatment of N-GABA. In addition, the oxidative stress induced by the

hyperglycemia causes BAX-associated events, that can lead to caspase activation and cell death by apoptosis. The obtained results showed that the level of the protein BAX in the brain of diabetic group increased compared with the control group. Such overexpression of the proapoptotic protein BAX may lead to mitochondrial dysfunction and even death of cells. Treatment with NAM or N-GABA resulted in the decrease of the content of BAX, and N-GABA had a more pronounced effect.

The influence of diabetes mellitus on cerebrovascular dysfunction may also be associated with the changes in vasodilator pathways that support cerebral blood flow under the physiological conditions. It has been shown that content of nNOS was declined in the diabetic rat brain while nNOS expression was increased under NAM or N-GABA treatment. The prototype of the angiogenic factor is VEGF. The obtained data allow to identified that the level of the VEGF protein in the diabetic rats brain was reduced compared to the control group and normalized under the treatment with NAM and N-GABA, indicating at least a partial normalization of the angiogenic response. The effect of N-GABA was more pronounced.

It has been shown that diabetes was also accompanied by the development of the reactive gliosis, as evidenced by the increased content of the glial fibrillary acid protein and its degradation products. The NAM treatment did not reduce the content of GFAP in the diabetic rat brain. However, N-GABA resulted in the increase of the content of this protein compared to the diabetic group of animals. The obtained data showed that the content of vimentin was not changed in the brain of the diabetic group and in the brain of the diabetic animal group treated with NAM compared to control, however the content of vimentin was significantly increased in the group of diabetic animals treated by N-GABA. We detected the changes of the content of three subunits of neurofilaments under TD. The studied compounds partially corrected these disorders.

Additionally, we have detected the disorders in the myelin sheath under pathological conditions, it is possible that due to changes in the myelin basic

protein. In addition, we have detected the alterations in the myelin sheath under the pathological conditions may be due to changes in the myelin basic protein. The MBP content was decreased under TD, while its content under NAM treatment was not differ compared to the diabetic group. However, the treatment with N-GABA had a potential therapeutic efficacy because of a slight restoration of the MBP content compared to the group of diabetic rats.

The obtained data suggest that type 1 diabetes is accompanied by the neuronal damage and the functional changes in the astroglial cells of the brain, a alteration of the blood-brain barrier permeability, and the high levels of GFAP and NF-L in serum indicate this. Treatment with NAM or N-GABA resulted in a partial reduction of the content of GFAP and NF-L in serum.

Additionally, changes of content of sirtuin 1 and 2 were detected in the nuclear extracts of the brain of diabetic rats, and NAM has a corrective effect.

Under hyperglycemia and metabolic changes in the kidneys, accompanied by a decrease of the NAD content and the ratio of free NAD / NADH couples, we found an increase of albumin content in the daily urine of diabetic animals that has indicated the development of microalbuminuria. Treatment with NAM diabetic rats led to a decrease of albumin content in urine and an increase of NAD content.

Thus, type 1 diabetes and its complications are accompanied by significant changes in blood, pancreas, peripheral and central nervous system, kidneys. The obtained results allowed to establish that tested compounds can partially or fully exert their effect under these disorders by suppressing the activation of oxidative stress, apoptosis, reactive gliosis, demyelination of neurons, restoration of vascular functions and redox balance.

Key words: diabetes mellitus, neuropathy, hyperglycemia, oxidative stress, apoptosis, NAD-dependent processes, mitochondria, poly-ADP-ribosylation, deacetylation, nicotinamide, nicotinoyl-gamma aminobutyric acid.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Кучмеровська ТМ, Донченко ГВ, **Тихоненко ТМ**, Гузик ММ, Яніцька ЛВ, Степаненко СП, Клименко АП. Вплив нікотинаміду на функціональний стан острівцевих клітин підшлункової залози. Укр. біохім. журн. 2012; 84(2): 81-88. *(Дисертантка приймала участь у виконанні експериментальної частини досліджень)*.
2. Сергійчук ЮТ, Конопельнюк ВВ, **Тихоненко ТМ**, Кучмеровська ТМ. Корекція окремих ланок обміну серотоніну за експериментального цукрового діабету 2 типу. Ендокринологія. 2014; 19(3): 210-216. *(Дисертантка приймала участь у виконанні експериментальної частини досліджень, взяла активну участь у аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті)*.
3. Сергійчук ЮТ, **Тихоненко ТМ**, Гузик ММ, Яніцька ЛВ, Кучмеровська ТМ. Вплив сумісної дії нікотинаміду, ацетил-І-карнітину та α -ліпоєвої кислоти на окремі ланки обміну вуглеводів за експериментального діабету 2 типу. Біологічні студії. 2014; 8(3-4): 41-52. *(Дисертантка приймала участь у виконанні експериментальної частини досліджень, взяла активну участь у аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті)*.
4. **Тихоненко ТМ**, Дякун КО, Сергійчук ЮТ. Мітохондріальна дегідрогеназна активність нервових закінчень мозку щурів. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2016; 73: 203-207. *(Дисертантка самостійно виконала всю експериментальну частину досліджень, статистично опрацювала отримані дані, здійснила аналіз результатів досліджень, оформила та написала статтю)*.
5. Кучмеровська ТМ, Яніцька ЛВ, **Тихоненко ТМ**, Привроцька ІБ. Нефропротекторний ефект нікотинаміду при експериментальному цукровому діабеті. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2017; 78(2): 31-36. *(Дисертантка приймала участь у виконанні*

експериментальної частини досліджень, взяла активну участь у аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті).

6. Яніцька ЛВ, **Тихоненко ТМ**, Гузик ММ, Кучмеровська ТМ. Участь поліолового шляху в розвитку дисфункцій мозку, індукованих експериментальним діабетом: ефект нікотинаміду. Ендокринологія. 2017; 22(3): 279-283. *(Дисертантка допомагала у виконанні експериментальної частини досліджень, статистично опрацювала отримані дані, здійснила аналіз результатів досліджень, брала участь в оформленні та написанні статті).*

7. Kuchmerovska ТМ, **Tykhonenko ТМ**, Guzyk ММ, Tykhomyrov АО, Yanitska LV. Nicotinamide and Nicotinoyl-Gaba in Prevention of Experimental Diabetic Neuropathy. Jacobs journal of diabetes and endocrinology. 2018; 4(1). *(Дисертантка приймала участь у створенні моделі, виконала частину експериментальних досліджень, статистично опрацювала отримані дані, взяла активну участь у аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті).*

8. Guzyk ММ, **Tykhonenko ТМ**, Dyakun КО, Yanitska LV, Pryvrotska ІВ, Kuchmerovska ТМ. Altered sirtuins 1 and 2 expression in the brain of rats induced by experimental diabetes and the ways of its correction. Ukr.Biochem.J. 2019; 91(1): 21-29. *(Дисертантка приймала участь у створенні моделі, статистично опрацювала отримані дані, взяла активну участь у аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті).*

9. **Тихоненко ТМ**, Донченко ГВ, Клименко АП, Ставнічук РВ, Кучмеровська ТМ. Цитотоксична дія стрептозотоцину на бета-клітини підшлункової залози щурів: ефект N-метилнікотинаміду. Матеріали науково-практичної конференції “Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології” (Десяті Данилевські читання). (Харків, 3-4 березня, 2011). Україна, 2011. С. 128-129.

10. Сергійчук ЮТ, **Тихоненко ТМ**, Кучмеровська ТМ. Сумісний вплив нікотинаміду, ацетил-L-карнітину та α -ліпоєвої кислоти на дисфункцію

мозку щурів за цукрового діабету 2-го типу. Матеріали XI Українського біохімічного конгресу опубліковані в Українському біохімічному журналі. (Київ, 6-10 жовтня 2014). Україна, 2014. Т. 86(5), С. 205.

11. Гузик ММ, Сергійчук ЮТ, **Тихоненко ТМ**, Яніцька ЛВ, Кучмеровська ТМ. Амінокислотний склад колагену і типу кісток за експериментального цукрового діабету: ефект нікотинаміду. Ендокринологія. 2014. Т. 19(4), С. 289.

12. Guzyk MM, **Tykhonenko TM**, Donchenko GV, Kuchmerovska TM. PARP-1 inhibition under oxidative stress in pancreatic islet cells. Materials of Joint meeting of the islet study group & beta cell workshop. (Jerusalem, May 3-7, 2015). Israel, 2015. P. 147.

13. **Тихоненко ТМ**, Дякун КО, Яніцька ЛВ, Кучмеровська ТМ. Нейропротекторий вплив сумісної дії нікотинаміду, α - ліпоєвої кислоти та І-ацетил карнітину за експериментального цукрового діабету. Матеріали Третьої міжнародної конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”. (Дніпропетровськ, 24-25 вересня, 2015). Україна, 2015. С. 83-84.

14. Гузик ММ, Дякун КО, **Тихоненко ТМ**, Яніцька ЛВ, Кучмеровська ТМ. Вплив інгібіторів полі ADP-рибopolімерази-1 (PARP-1) на клітини підшлункової залози лінії RINm5f. Матеріали IV Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю “Хімія природних сполук”. (Тернопіль, 21-22 квітня, 2016). Україна, 2016. С. 75-76.

15. Kuchmerovska TM, Ianitska LV, Guzyk MM, **Tykhonenko TM**, Pakyrbaeva LV, Dyakun KO. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibitors in correction of experimental diabetic neuropathy. Materials of VIII Lviv-Lublin conference of experimental and clinical biochemistry. (Lublin, 18-20 September, 2017). P. 26.

16. **Тихоненко ТМ**, Гузик ММ, Дякун КО, Кучмеровська ТМ. 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. (Харків, 28 лютого -1 березня, 2019). Україна, 2019. С. 123-124.

17. **Tykhonenko TM**, Tykhomyrov AO, Guzyk MM, Dyakun KO, Kuchmerovska TM. The effects of nicotinamide on the brain functional protein markers in prevention of diabetic neuropathy. Materials of 32nd ECNP (European College of Neuropsychopharmacology) Congress. Published in in supplement to the journal European Neuropsychopharmacology (Copenhagen, 7-10 September, 2019). Denmark, 2019, T. 29, supplement 6, P. s554-s555.

18. **Тихоненко ТМ**, Тихомиров АО, Гузик ММ, Дякун КО, Кучмеровська ТМ. 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), С. 242.

19. Kuchmerovska TM, **Tykhonenko TM**, Tykhomyrov AO, Guzyk MM. 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), P. 202-203.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	20
ВСТУП	22
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	29
1.1. Фізико-хімічні властивості та біологічне значення вітаміну B ₃ та його похідних	29
1.2. Патогенетичні механізми залучені до метаболічних, структурних та функціональних порушень за ЦД та його ускладнень	34
1.3. Реалізація механізмів дії вітаміну B ₃ через NAD-залежні процеси	45
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	52
2.1. Матеріали та обладнання	52
2.2. Моделювання експериментального ЦД 1 типу та схема введення похідного вітаміну B ₃ та його кон'югату з ГАМК	54
2.3. Виділення мітохондрій із головного мозку	54
2.4. Одержання препаратів лейкоцитів з периферичної крові щурів	55
2.5. Оцінка перерозподілу між різними популяціями лейкоцитів	55
2.6. Оцінка рівня оксидативного стресу та життєздатності клітин	55
2.7. Визначення мембранного потенціалу мітохондрій у лейкоцитах крові	56
2.8. Визначення концентрації протеїну	56
2.9. Приготування лізатів тканин	56
2.10. Електрофорез протеїнів у ПААГ	57
2.11. Вестерн-блот аналіз протеїнів	57
2.12. Приготування безпротеїнових екстрактів тканин	58
2.13. Ензиматичне визначення вмісту метаболітів, активності ензимів та вільних NAD ⁺ /NADH, NADP ⁺ /NADPH пар	59

2.14. Гістологічна оцінка стану підшлункової залози	60
2.15. Гістологічна оцінка стану сідничного нерва	60
2.16. Імуногістохімічний аналіз мозку	61
2.17. Визначення рівня альбуміну	62
2.18. Культивування клітин лінії RIN-m5F	62
2.19. Оцінка життєздатності клітин RIN-m5F за допомогою МТТ-тесту	62
2.20. Визначення рівня АФК та мембранного потенціалу мітохондрій на клітинній лінії RIN-m5F	63
2.21. Культивування клітин лінії EA.hy926	64
2.22. Візуалізація мітохондрій клітин EA.hy926	65
2.23. Визначення мембранного потенціалу мітохондрій на клітинній лінії EA.hy926	65
2.24. Статистична обробка результатів	66
РОЗДІЛ 3. ПОКАЗНИКИ РОЗВИТКУ ПАТОГЕНЕТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ ЗА ЦД 1 ТИПУ ТА ЗА ДІЇ НА ЙОГО ТЛІ NAM ТА N-GABA	67
3.1. Показники, які характеризують розвиток ЦД 1 типу	67
3.2. Структурно-морфологічний стан підшлункової залози за ЦД 1 типу	69
3.3. Дія NAM та N-GABA на життєздатність, рівень АФК та мембранний потенціал мітохондрій лейкоцитів периферичної крові	71
3.4. Ефект NAM на життєздатність клітин RIN-m5F	75
3.5. Рівень АФК клітинної лінії RINm5F за дії NAM	77
3.6. Мембранний потенціал мітохондрій клітин RINm5F: ефект NAM	78
3.7. Вплив NAM на ендотелійні клітини EA.hy926 за високої концентрації глюкози	80

РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ ПЕРЕБІГУ ОСНОВНИХ ПАТОГЕНЕТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ ЗА УСКЛАДНЕНЬ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ	86
4.1. Структурні та метаболічні зміни у сідничному нерві індуковані ЦД 1 типу	86
4.2. Дія NAm та N-GABA на перебіг ключових патогенетичних процесів у мозку за ЦД 1 типу	91
4.3. Перебіг досліджуваних патогенетичних процесів у нирках за ЦД 1 типу	115
Узагальнення результатів дослідження	121
ВИСНОВКИ	126
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	128
ДОДАТОК. СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ	155

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ADPRTs	ADP-рибозилтрансфераза
AGE	кінцеві продукти глікозилювання
AR	альдозоредуктаза
ATP	аденозинтрифосфат
cADPR	циклічна ADP -рибоза
CD38	циклічна ADP -рибоза
CD157	циклічна ADP -рибоза
CtBP	C-кінець звязуючий протеїн
GAPDH	гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа
GFAP	гліальний фібрилярний кислий протеїн
MAPK	мітоген-активуючі протеїнкінази
MBP	основний протеїн мієліну
Mn-SOD	Mn-залежна супероксиддисмутаза
NA	нікотинова кислота
NAAD ⁺	динуклеотид нікотинової кислоти
NAD ⁺	окиснений нікотинамідаденіндинуклеотид
NADH	відновлений нікотинамідаденіндинуклеотид
NADP ⁺	окиснений нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат
NADPH	відновлений нікотинамідаденін-динуклеотидфосфат
NADS	NAD ⁺ синтетази
NAm	нікотинамід
NAMPT	нікотинамідмононуклеотид
NAMN	мононуклеотид нікотинової кислоти
N-GABA	нікотиноіл-гамма-аміномасляна кислота
NMNAT	нікотинамідмононуклеотидаденілтрансфераза
NO	нітроген (II) оксид
NOS	NO-синтаза
eNOS	ендотелійна NO-синтаза

iNOS	індуцибельна NO-синтаза
nNOS	нейрональна NO-синтаза
NOX	нікотинамідіденнунуклеотидфосфат оксидаза
NR	нікотинамідрибозид
NRK	нікотинамідрибозидкіназа
NF-κB	транскрипційний ядерний фактор κB
NF-H	нейрофіламенти високої щільності
NF-M	нейрофіламенти середньої щільності
NF-L	нейрофіламенти низької щільності
PAR	полі-ADP-рибоза
PARP-1	полі(ADP-рибозо)полімераза-1
PARs	полі-ADP-рибозильовані протеїни
PKC	протеїнкіназа C
VEGF	фактор росту ендотелійних клітин судин
АФК	активні форми кисню
ГАМК	гамма-аміномасляна кислота
ДН	діабетична нейропатія
ОС	оксидативний стрес
СТЗ	стрептозотоцин
ЦД	цукровий діабет
ЦНС	центральна нервова система

ВСТУП

Актуальність теми. Вітаміни та їх біологічно активні похідні беруть участь у життєво важливих метаболічних процесів всіх живих організмів. Сучасні біохімічні дослідження в галузі вітамінології спрямовані на з'ясування їх залучення до механізмів регуляції внутрішньоклітинного обміну та пошуку нових шляхів прояву функціональної дії [1]. Дослідження останніх років поглибили розуміння біологічної ролі вітамінів, у тому числі і вітаміну В₃. Інтерес до вітаміну В₃ та його похідних зростає завдяки його універсальній біохімічній функції в організмі.

Вітамін В₃ є попередником біосинтезу нікотинамідаденіндинуклеотидів (NAD), а також нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату (NADP), обидва з яких є коензимами для численних метаболічних ензимів. NAD є ключовим коензимом у синтезі аденозинтрифосфату (АТФ), а також субстратом таких ензимів як полі-(ADP-рибозо)-полімерази (PARP), NAD-залежних деацетилаз (сіртуїнів) та циклічних ADP-рибоз (сADPR), CD38 і CD157, які забезпечують репарацію ДНК, модифікації деяких протеїнів, зокрема гістонів, та стійкість до стресів, беруть участь у регуляторних процесах. Також важливим є транскрипційний корепресор CtBP, який взаємодіє з кількома клітинними і вірусними репресорами транскрипції, пригнічуючи експресію специфічних генів, що беруть участь у розвитку, регуляції клітинного циклу і клітинній трансформації. [2]. Біологічно активне похідне вітаміну В₃ - нікотиноіл-гамма-аміномасляна кислота (N-GABA) – це кон'югат гамма-аміномасляної (ГАМК) та нікотинової кислот, який поєднує властивості цих двох компонентів. Він швидше, ніж нікотинат, всмоктується у кров, на відміну від ГАМК долає гематоенцефалічний бар'єр, де може приймати участь у функціонуванні головного мозку. ГАМК є головним інгібуючим нейромедіатором в центральній нервовій системі (ЦНС), а також проявляє функціональну активність в інших периферичних тканинах.

Вітамін В₃ та його похідні з успіхом застосовують для лікування багатьох нейродегенеративних та психічних захворювань, зокрема епілепсії, шизофренії, хвороби Паркінсона, психозів [3]. Особливо актуальним є питання про застосування нікотинаміду в корекції метаболічних порушень при цукровому діабеті, який супроводжується численними ускладненнями та є одним із найбільш поширених захворювань на сьогодні [4]. З кожним роком кількість хворих на ЦД як 1, так і 2 типу невпинно зростає. За прогнозами Міжнародної федерації діабету (IDF) їх кількість до 2045 року становитиме 629 мільйонів. [5]. Однак, на даний час з'ясування механізмів, які лежать в основі розвитку ЦД та його ускладнень, а також лікування залишається надзвичайно важливою медико-соціальною проблемою. Цукровий діабет – як 1 так і 2 типу – мультифакторне захворювання, яке пов'язане з абсолютною або відносною недостатністю інсуліну та/або порушенням його секреції або дії. До розвитку ЦД призводять різні ендогенні та екзогенні фактори, внаслідок чого виникає гіперглікемія, яка “запускає” різні патологічні процеси, які призводять до ушкодження судин, нервів, органів і тканин, що найчастіше є причиною ранньої інвалідності та летальності [6]. Гіперглікемія може спричиняти пошкодження тканини за рахунок таких основних механізмів: збільшення потоку глюкози та інших моносахаридів через поліоловий шлях, посилене утворення внутрішньоклітинних кінцевих продуктів глікозилювання, збільшення експресії рецептора для кінцевих продуктів глікозилювання та його активованих лігандів, активацію протеїнкінази С (PKC) та гексозамінового шляху. Дані літератури вказують на те, що всі вищезазначені механізми активуються надпродукцією активних форм кисню мітохондріями (АФК) [7]. Усунення цих порушень відкриває перспективи профілактики ускладнень ЦД. Інтерес науковців до вивчення цього захворювання не згасає і спонукає їх до пошуку нових підходів для запобігання розвитку та лікування цукрового діабету і його ускладнень. Пошук має певні труднощі, обумовлені значною гетерогенністю даного захворювання.

Дисертаційна робота націлена на з'ясування механізмів дії вітаміну В₃ та його регуляторного впливу у NAD-залежних процесах за цукрового діабету та його ускладнень. Виявлення нових функціональних мішеней дії вітаміну В₃ сприятиме розумінню перебігу цих процесів та може бути основою для розробки нових методів і засобів для профілактики та лікування даного захворювання та його ускладнень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась у рамках наукових досліджень відділу біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України у відповідності з напрямком науково-дослідних робіт Інституту за темами: “Дослідження молекулярних механізмів реалізації біологічної ролі вітамінів, коензимів та їхніх протеїнів-акцепторів у забезпеченні функціонування та життєздатності клітин за норми та за умов деяких патологій” (2007-2011 рр., № д.р.0107V003251), “Роль вітамінів А, Е, В₁, РР, Д₃, убіхінону та їх коензимів у забезпеченні функціонування спеціалізованих клітин за норми та за умов ініціації їх загибелі” (2012-2016 рр., № д.р. 0112U002625), “Молекулярні механізми залучення вітамінів, їх метаболічно активних похідних і коензимів у функціонування регуляторних систем клітин за норми та патологічних станів” (2017-2021 рр., № д.р. 0117U004345). Роботу було підтримано Премією Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України за кращу наукову роботу молодих вчених у 2015 та 2018 роках та грантом для візиту молодих науковців НАН України на стажування у науково-дослідну установу Польської Академії Наук.

Мета дослідження. Дослідити молекулярні механізми дії вітаміну В₃ та його біоактивних похідних за цукрового діабету 1 типу.

Для досягнення мети були поставлені наступні **завдання**:

1. З'ясувати, чи володіють NAm та N-GABA протизапальною, антиоксидантною та гіпоглікемічною дією за ЦД 1 типу;
2. Оцінити дію NAm та N-GABA на метаболічні та структурні зміни у сідничному нерві, індуковані ЦД 1 типу;

3. Охарактеризувати стан поліолового шляху обміну глюкози у мозку діабетичних щурів та за введення тваринам NAm та N-GABA;

4. Оцінити вміст протеїнів: транскрипційного фактору κB (NF- κB), проапоптичного протеїну BAX, нейрональної NO-синтази (nNOS) та фактору росту ендотелійних клітин судин (VEGF) у тканині головного мозку щурів за ЦД 1 типу та його корекції;

5. Визначити вміст гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP), триплету протеїнів нейрофіламентів (NF), протеїну віментину, основного протеїну мієліну (MBP) у тканині головного мозку щурів за ЦД 1 типу та за дії NAm та N-GABA.

Об'єкт дослідження. Молекулярні механізми опосередкованого NAm та N-GABA регулювання NAD-залежних процесів за ЦД 1 типу та його ускладнень.

Предмет дослідження. Участь NAm та N-GABA у регулюванні вмісту цитоскелетних та нейроспецифічних протеїнів у мозку за ЦД 1 типу.

Методи дослідження. Для виконання роботи було застосовано біохімічні та оптичні (спектрофотометрія, протокова цитометрія, світлова та конфокальна мікроскопія); молекулярно-біологічні (електрофорез, імуноблотинг, імуногістохімія); методи роботи із культурою клітин еукаріот (культивування, оцінка їх функціонального стану), статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше на моделі експериментального цукрового діабету 1 типу було проведено комплексне біохімічне дослідження щодо з'ясування механізмів дії NAm та N-GABA. Виявлено, що NAm та N-GABA проявляють антиоксидантну та протизапальну дію, а останній - також слабку гіпоглікемічну дію. Встановлено, що ці сполуки, пригнічуючи активацію поліолового шляху обміну глюкози в мозку, його структурах та у сідничному нерві, також запобігають структурним змінам у цих органах, відновлюючи їх функції. Вперше було продемонстровано, що на тлі цих порушень у мозку діабетичних тварин відбуваються суттєві зміни вмісту ключових протеїнів,

підтвердженням чого є зниження вмісту nNOS, VEGF, MBP, NF-L, NF-H, у той час як вміст NF-κB, BAX, GFAP, NF-M підвищувався, однак вміст віментину не змінювався. Було вперше встановлено, що механізми дії NAm та N-GABA реалізуються як через NAD-залежні процеси, так і опосередковано із залученням інших процесів на рівні вмісту протеїнів, оскільки NAm та N-GABA проявляли коригуючий ефект на вміст nNOS, VEGF, NF-κB, BAX, при чому NAm мав більш нормалізуючий ефект на вміст NF-L, NF-H, а N-GABA на вміст MBP. Також нами вперше встановлено, що введення N-GABA призводило до підвищення вмісту протеїну віментину та GFAP, що може бути результатом проліферації астроцитів, як адаптаційно-захисної реакції. Нами виявлено, що у мозку діабетичних тварин відбувається порушення структурної цілісності його клітин та порушення проникності гематоенцефалічного бар'єру, доказом чого було підвищення вмісту GFAP та NF-L у сироватці крові діабетичних тварин, вміст яких знижувався при застосуванні NAm та N-GABA, що було встановлено нами вперше.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані результати мають не тільки фундаментальне значення, поглиблюючи уявлення щодо механізмів дії вітаміну B₃ та його біологічно активних похідних за цукрового діабету, але й сприятимуть вдосконаленню методів корекції функціональних порушень у тканинах підшлункової залози, мозку, сидничного нерва, нирках, які виникають за цієї патології. Завдяки їх антиоксидантній, протизапальній дії, а також реалізації дії на рівні ключових протеїнів мозку ці сполуки можна рекомендувати для використання в клініці ЦД та його ускладнень. Крім того, результати дослідження сприятимуть пошуку методичних підходів для створення нових кон'югованих препаратів на основі вітаміну B₃ та його біологічно активних похідних для корекції виявлених порушень у клітинах, тканинах та органах, індукованих цукровим діабетом.

Результати досліджень використовуються у навчальному процесі та

науковій роботі кафедри біоорганічної та біологічної хімії Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця, а також можуть бути використані у навчальних програмах та науковій роботі інших вищих навчальних закладів біологічного та медичного профілю.

Особистий внесок здобувача. Усі наукові результати дисертаційної роботи отримано автором самостійно або за його безпосередньої участі. Дисертантка самостійно провела пошук та аналіз даних наукової літератури за тематикою роботи, відпрацювала низку методик та провела експериментальну роботу у запланованому обсязі.

План дисертаційної роботи, аналіз результатів, їх обговорення та 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. Дослідження на протоковому цитофлюориметрі проведено спільно з к.б.н. Гузиком М.М. (відділ біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України). Імуногістохімічний та вестерн-блот аналізи проведено за допомогою к.б.н. Тихомирова А.О. (відділ хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України). Гістологічні дослідження проведено за допомогою к.б.н. Савосько С.І. (кафедра гістології та ембріології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця). Автор також щиро вдячний усім співавторам публікацій за темою дисертації.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи пройшли апробацію на XI Українському біохімічному конгресі (Київ, Україна, 6-10 жовтня, 2014), міжнародній науковій конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології” (Дніпропетровськ, Україна, 24-25 вересня, 2015), IV Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю “Хімія природних сполук” (Тернопіль, Україна, 21-22 квітня, 2016), VIII Львівсько-Люблінській конференції експериментальної та клінічної біохімії (Люблін, Польща, 18-

20 вересня, 2017), науково-практичних конференціях “Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології,” “Десяті Данилевські читання” (Харків, Україна, 3-4 березня, 2011) та “Вісімнадцяті Данилевські читання” (Харків, Україна, 28 лютого-1 березня, 2019), XII Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, Україна, 30 вересня – 4 жовтня, 2019), 32 конгресі Європейського коледжу нейропсихофармакології (Копенгаген, Данія, 7-10 вересня, 2019).

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 8 статей у фахових журналах та 11 тез доповідей у збірниках матеріалів конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 158 сторінках та проілюстрована 27 рисунками і 7 таблицями, складається з анотації, переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, результатів дослідження та їх обговорення, висновків, списку використаних джерел – 241 посилань.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Фізико-хімічні властивості та біологічне значення вітаміну В₃ та його похідних

Серед сполук, які відіграють життєво важливу роль у багатьох біохімічних функціях організму є вітаміни. На даний час значна увага зосереджена на з'ясуванні механізмів дії вітаміну В₃ та його біологічно активних похідних. У живій природі вітамін В₃ існує у двох біологічно активних формах: нікотинова кислота (NA) (міститься в продуктах рослинного походження, C₆H₅O₂N) та нікотинамід (NAm) (міститься в продуктах тваринного походження, C₆H₆ONH₂), (Рис.1.1). NA спочатку була синтезована у 1867 році шляхом окиснення нікотину хромовою кислотою, а вже пізніше виділена з деяких продуктів харчування. Дію NA було виявлено в 1930-х роках. Недостатність вітаміну В₃ в організмі може призвести до стану, відомого як пелагра, яка характеризується захворюванням шкіри (дерматит) [8], тяжкими розладами системи органів травлення (діарея) та ураженнями нервової системи (деменція) [3] і навіть може призводити до смерті. Рекомендована добова доза для чоловіків та жінок становить 16 мг і 14 мг відповідно, ця доза збільшується до 18 мг під час вагітності та до 17 мг для жінок, що годують. Нікотинова кислота з молекулярною масою 125,5 являє собою кристали без кольору, без запаху, слабокислі на смак, які мають вигляд голок з температурою плавлення 235,5°C та має два максимуми поглинання в ультрафіолеті при 381,5 та 365 нм, а також помірно розчинна у воді та спирті та малорозчинна в органічних розчинниках. Нікотинамід, амідна форма вітаміну В₃, являє собою безколірні голки з температурою плавлення 131-132°C та кристалізується в чотирьох поліморфних формах. Дуже добре розчиняється у воді та спирті, екстрагується з водних розчинів хлороформом, етилацетатом та деякими іншими органічними розчинниками. Практично не розчиняється в бензолі та ефірі.

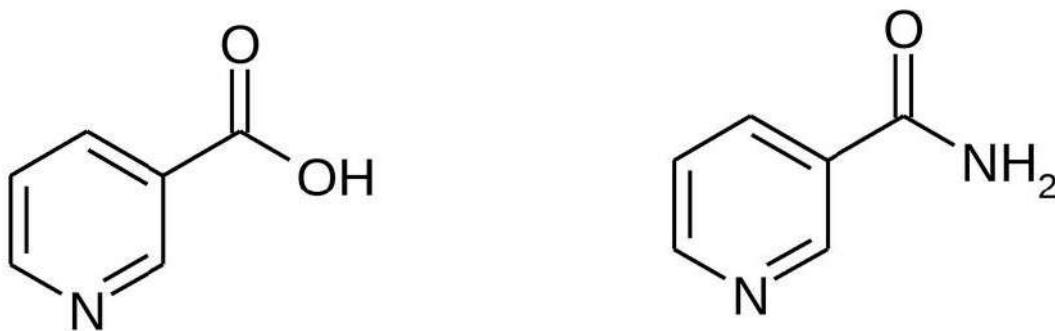


Рисунок 1.1. Структурна формула нікотинової кислоти (зліва) та нікотинаміду (справа).

Характерною властивістю НА є її здатність утворювати подібно β-імінокислотам бетаїни, наприклад тригонелін-N-метилнікотинамід, у вигляді якого НА виділяється з організму як продукт кінцевого перетворення. Вітамінну активність у повній мірі має НА та NAm. У ізомерних піколінової та ізонікотинової кислот біологічна активність відсутня [9].

Характерні ознаки В₃-вітамінної недостатності розвиваються при тривалому харчуванні продуктами, які містять незначні кількості триптофану (злаки, рис, кукурудза). Людина та більшість представників ссавців, птахів, земноводних, комах, грибів, вищих рослин, а також деякі бактерії здатні синтезувати НА. В організмі тварин існує два шляхи біосинтезу НА: в кишково-шлунковому тракті за рахунок мікроорганізмів та метаболізм ендogenous триптофану, незамінної амінокислоти, що міститься в більшості протеїнів. Нікотинамід зберігається лише в невеликих кількостях в печінці, причому більшість метаболітів його обміну або виводяться з організму, або катаболізуються. Разом з тим надходження в організм його надмірних доз або передозування може викликати гепатотоксичність та порушення синтезу протеїнів [10].

Нікотинамід володіє надзвичайно широким спектром дії, він залучений у цілу низку біологічних процесів, зокрема у біосинтез NAD⁺, функціонування імунної системи, інгібування транскрипції та трансляції,

пригнічує окисне пошкодження мембран у різних тканинах організму за дії активних форм кисню та ін. [11].

Наші попередні дослідження також показали, що NAM здатний запобігати розвитку дисфункцій β -клітин підшлункової залози [12] та виявляти нейротропну дію як за фізіологічних умов, так і за розвитку деяких патологічних станів нервової системи, зокрема діабетичної енцефалопатії [13]. Було показано, що дія NAD^+ може реалізуватись принаймні частково на рівні регуляції процесів синаптичної передачі опосередкованих NAD^+ сигнальних систем, а також через взаємодію з іншими біологічно активними сполуками [14]. У свою чергу, NAD^+ відіграє важливу роль у клітинному диханні, репарації розривів дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) індукованих дією різних чинників, пострасляційній модифікації протеїнів тощо [15, 16].

Ключовою мішенню дії нікотинаміду є полі(ADP-рибозил)-полімераза (PARP), і в меншій мірі моно-ADP-рибозилтрансфераза (ADPRTs). Пригнічення активності PARP нікотинамідом не тільки знижує використання NAD^+ , субстрату полі-ADP-рибози, але також має значні регуляторні ефекти на експресію генів, як показано для основного гена комплексу класу II гістосумісності. Крім того, активність PARP контролює ранні етапи апоптозу. Також NAD^+ є ко-субстратом у різних реакціях деацитування, що каталізуються сіртуїнами. Можливе пригнічення ADPRTs нікотинамідом також впливає на CD38, мембранозв'язувану зовнішню циклічну ADP-рибозу з потужними імунорегуляторними властивостями [17].

Нікотиноіл-гамма-аміномасляна кислота (N-GABA), пікамілон, розроблений в 1970 році російськими дослідниками Всесоюзного науково-дослідного інституту вітамінів (Москва, СРСР) В. М. Копелевичем, Л. М. Шмуїловичем, В. І. Трубніковим з метою підвищення рівня гамма-аміномасляної кислоти у центральній нервовій системі, являє собою натрієву сіль N-нікотиноіл-гамма-аміномасляної кислоти. У хімічному

відношенні є кон'югатом ГАМК і нікотинової кислоти (рис.1.2). Фармакологічно препарат також поєднує властивості цих двох компонентів [18]. N-GABA швидше, ніж нікотинат, всмоктується в кров, на відміну від ГАМК долає гематоенцефалічний бар'єр, де може приймати участь у функціонуванні головного мозку. Експериментальні та клінічні дослідження показали, що здатність пікамілону накопичуватися у мозку приблизно в десять разів перевищує ГАМК [18]. Також не було виявлено значної тенденції щодо розкладання нікотиноїл-гамма-аміномасляної кислоти на НА і ГАМК. Цей факт і деякі інші спостереження дозволяють припустити, що пікамілон у незмінній формі здатний впливати на рецептори ГАМК [19]. Були проведенні дослідження біотрансформації міченого N-GABA і показано, що це стійка сполука і виводиться нирками з організму практично в незміненому вигляді [20]. Пікамілон введений в медичну практику у 1986 році. Це білий кристалічний порошок без запаху, легко розчинний у воді, гігроскопічний з молекулярною масою 230,2. Хоч ГАМК і нікотинова кислота знайдені в природі, пікамілон виробляється тільки синтетично і не має відомого природного джерела [21].

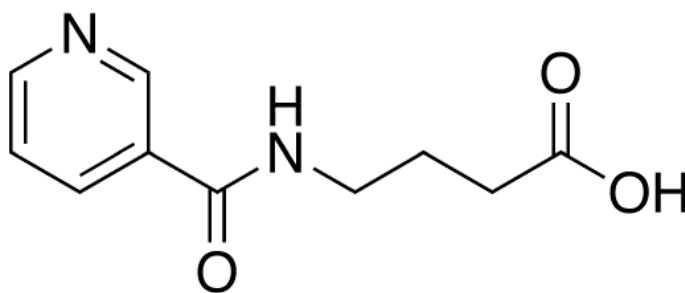


Рисунок 1.2. Структурна формула нікотиноїл-гаммааміномасляної кислоти (C₄H₉O₂N).

N-GABA стимулює окисно-відновні процеси, підвищує споживання нервовою тканиною кисню і глюкози, після ішемії сприяє відновленню процесів утилізації енергетичних субстратів, запобігає зростанню концентрації молочної кислоти у тканині мозку, має більш сильний і тривалий вплив на кровообіг мозку порівняно з іншими похідними ГАМК

та NA, запобігає розвитку системної ендотелійної дисфункції та володіє ендотеліо- і кардіопротектною дією [22]. Серцево-судинні ефекти препарату в значній мірі обумовлені його здатністю проникати через гематоенцефалічний бар'єр і впливати на центральні ГАМК-ергічні процеси вазомоторної регуляції [23].

Пікамілон широко застосовується як засіб, що забезпечує позитивні цереброваскулярні, ноотропні та транквілізуючі ефекти [24].

Попередні дослідження, проведені у відділі біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна, показали, що введення NAm або N-GABA діабетичним тваринам сприяло нормалізації функціонування NAD-рецепторної системи мозку, нормалізуючи рівень нуклеотидів у тканинах та NAD-азну активність [13], мало коригувальний вплив на процеси поглинання і вивільнення серотоніну і ГАМК синаптосомами мозку щурів, таким чином, сприяючи частковій нормалізації функціонування відповідних нейромедіаторних систем, які можуть бути викликані порушенням функціонування рецепторів ГАМК або її транспортерів. Було встановлено, що нікотинамід і особливо ГАМК відіграють важливу роль в частковій нормалізації функціонування ГАМК-бензодіазепінового комплексу мозку, порушеного при діабеті [25].

Зміни в ГАМК-ергічній нейромедіаторній системі, пов'язані з хворобою Хантінгтона, хворобою Паркінсона, старечою деменцією, судомою, хворобою Альцгеймера, синдромом скутості і шизофренією, оскільки глутамат призводить до збудження нейронів людини, а його продукт (ГАМК) до гальмування. Так, при дуже низькому вмісті ГАМК в мозку розвивається хвороба Альцгеймера [26]. Відомо, що ГАМК може потенційно пригнічувати розвиток хронічного захворювання нирок, знижувати оксидативний стрес, викликаний нефректомією та підвищувати імунітет за умов стресу протягом короткої тривалості [27]. ГАМК також може застосуватися для профілактики і лікування захворювань, пов'язаних з алкогольною інтоксикацією. Крім того, ця амінокислота сприяє підвищенню

концентрації гормону росту в плазмі та посилює його синтез в мозку [28]. Недавні дослідження також показали, що ГАМК посилює секрецію інсуліну β -клітинами підшлункової залози і, отже, може запобігати розвитку діабету [29]. ГАМК може затримувати або пригнічувати інвазію і метастазування різних типів ракових клітин, таких як ракові клітини молочної залози [30], товстої кишки [31] і печінки [32]. Крім того, ГАМК володіє протизапальними і проліферативними властивостями у фібробластів, які сприяють загоєнню шкірних ран. ГАМК може пригнічувати запалення при ревматоїдному артриті [33]. У кількох повідомленнях згадується зв'язок між ГАМК і розладами настрою. Низький рівень ГАМК в плазмі може бути біологічним маркером розвитку розладів настрою [34-37]. Не виключено, що N-GABA може також проявляти таку дію.

1.2. Патогенетичні механізми залучені до метаболічних, структурних та функціональних порушень за ЦД та його ускладнень

За багатьох патологічних станів відбуваються суттєві зміни у метаболізмі вітаміну B_3 та його біологічно активних похідних, не виключенням є ЦД, який супроводжується численними ускладненнями. Цукровий діабет - це метаболічне захворювання, що характеризується хронічною гіперглікемією внаслідок порушення секреції інсуліну та/або його дії. Вважають, що патогенез ЦД 1 типу - автоімунний процес, переважно опосередкований T-клітинами, що призводить до прогресивного руйнування β -клітин підшлункової залози і, як наслідок, до дефіциту інсуліну. Це, в свою чергу, призводить до зниження або взагалі до відсутності відповіді на дію глюкози та інші стимули. При цьому загибель β -клітин підшлункової залози є ключовим фактором у патогенезі цукрового діабету 1-го типу. Цей тип діабету зазвичай діагностується у 5–10% від загальної кількості хворих і проявляється найчастіше у осіб віком до 30 років, проте може виникати і в осіб похилого віку. ЦД 1 типу супроводжується такими симптомами як спрага, голод та поліурія [38]. За

ЦД 1 типу виникає не тільки гіперглікемія, але і може виникати глюкозурія. На початку цього захворювання може спостерігатися ацидоз, що в свою чергу може супроводжуватися кетонурією. Діабет 2-го типу переважно асоційований з резистентністю до інсуліну периферійних органів, таких як скелетні м'язи, жирова тканина, печінка. За його перебігу порушуються функції β -клітин підшлункової залози, що призводить до змін у секреції інсуліну, а також його дії на тканини-мішені, що спричиняє дисфункції β -клітин підшлункової залози і, як наслідок, може супроводжуватися розвитком апоптозу або некрозу в цих клітинах. Метаболічні зміни в обміні вуглеводів, ліпідів та протеїнів за ЦД можуть бути зумовлені регуляторним впливом інсуліну на ключові процеси метаболізму [39]. Так, при низькому рівні інсуліну відбуваються метаболічні порушення, за яких не може існувати адекватна відповідь тканин-мішеней, на рівні інсулінових рецепторів, системи трансдукції інсулінового сигналювання та/або ефекторних ензимів або генів. Тяжкість симптомів залежить від типу і тривалості діабету. Так, у пацієнтів, які хворіють на цукровий діабет 2 типу, протягом перших років захворювання, практично відсутні характерні ознаки хвороби, у той час як за діабету 1 типу спостерігається виражена гіперглікемія, і особливо у дітей з абсолютним дефіцитом інсуліну, що супроводжується поліурією, полідипсією, поліфагією, втратою ваги та розмитістю зору. Більше того, вплив факторів навколишнього середовища, зокрема харчових антигенів, токсинів і особливо вірусних інфекцій, також може призводити до розвитку цього захворювання. Протягом останніх десятиліть ЦД став основною причиною захворюваності та смертності, а також він дуже "помолодшав" [40].

За гіперглікемії відбувається активація різних сигнальних механізмів, таких як поліолового шляху, підвищене утворення кінцевих продуктів глікозилювання, активація протеїнкінази C та гексозаміну, опосередковане NF- κ B судинне запалення, які, у свою чергу, призводять до пошкодження клітин та прогресування діабетичних ускладнень. Вважають, що ці

механізми активуються за рахунок надпродукції активних форм кисню мітохондріями [41-44].

Дійсно, у метаболічних процесах всіх клітин організму мітохондрії відіграють ключову роль. Ці органели мають вирішальне значення не тільки в продукуванні АТР, але і в хелатуванні кальцію, біосинтетичних шляхах, генерації АФК і загибелі клітин. У розвитку захворювань нервової системи суттєва роль належить мітохондріям ендотелійних клітин. В залежності від локалізації і функцій ендотелію, вміст мітохондрій в ендотелійних клітинах може різко змінюватися, як і функції самих клітин [45]. Як правило, ангиогенез призводить до парадоксального посилення гліколізу, оскільки глюкоза є більш доступною, ніж кисень, а також до окислення β -жирних кислот, яке відбувається в мітохондріях, але за порушення цього процесу порушується і ріст судин. Таким чином, очевидно, що дисфункція мітохондрій лежить в основі ендотелійного ушкодження, як правило, при запаленні, оксидативному стресі, загибелі клітин і пригніченні функцій тканин [46-48]. Було також показано, що ензим нікотинамідденунуклеотидфосфат оксидаза 4 (NOX4) мітохондрій ендотелійних клітин за певних умов може інгібувати комплекс I дихального ланцюга, що призводить до посиленого продукування АФК [49]. Підвищення активності NOX призводить до посилення оксидативного стресу і загибелі клітин [50], що, в свою чергу призводить, до порушення процесу ангиогенезу [51, 52]. Це свідчить про те, що цей ензим залучений до діабет-асоційованого продукування АФК [53]. Іншим регулятором продукції мітохондрійних АФК, з явними наслідками для ендотелійної дисфункції, є протеїн p66Shc, який реагує на високу концентрацію глюкози в крові шляхом міграції в мітохондрії та індукуванням окислення ключових ефекторів, що призводить до загибелі клітин та пригнічення функцій тканин. Зокрема, протеїн p66Shc може окислювати відновлений цитохром c, який накопичується за відсутності кисню [54].

За хронічного перебігу діабету розвиваються як мікросудинні, так і макросудинні ускладнення. За рівня гіперглікемії, що перевищує 5,5 ммоль/л натщесерце та 7,8 ммоль/л після прийому їжі, зростає ризик розвитку пошкоджень макросудин, а для мікросудин - при 6,0 ммоль/л та 9,0 ммоль/л відповідно [55]. Як наслідок впливу гіперглікемії судини хворих на діабет зазнають ряд структурних, метаболічних та функціональних змін. Мікросудинні ускладнення є характерними для нефропатії, нейропатії та ретинопатії, які є специфічними для діабету. Макроваскулярні ускладнення в основному супроводжуються атеросклеротичними захворюваннями та їх проявами, та виникають переважно як ішемічна хвороба серця, цереброваскулярна хвороба; вони не є специфічними для діабету, але люди, в яких розвинувся ЦД 1 типу, схильні до розвитку цих ускладнень [56, 57].

Поліоловий шлях - це двоетапний метаболічний шлях. У першій реакції поліолового шляху обміну глюкози за участю ключового ензиму альдозоредуктази глюкоза перетворюється на сорбітол, а NADPH при цьому окиснюється, у другій — утворюється фруктоза за участю D-сорбітолдегідрогенази, відновлюючи NAD^+ . Ці ензими локалізовані в цитоплазмі клітин багатьох тканин, зокрема в периферичних нервах [58]. Таким чином, загальними продуктами поліолового шляху є сорбітол, фруктоза та NADH. Оскільки майже 30% глюкози у крові може протікати через поліоловий шлях за ЦД, то цей шлях вважається головним, що спричиняє окисно-відновний дисбаланс NADH/NAD^+ внаслідок перетворення NADPH в NADH [59]. Ензимом, що лімітує швидкість цих двох послідовних реакцій, є D-сорбітолдегідрогеназа, тому сорбітол акумулюється в тканинах у значно більших кількостях, ніж фруктоза. Обидва ензими мають широкий спектр субстратної специфічності, сприяючи перетворенню багатьох поліолів. У фізіологічних умовах лише 1-2% обміну глюкози здійснюється через поліоловий шлях, який функціонує в багатьох тканинах організму, проте його фізіологічну роль встановлено лише для статевих залоз чоловіків, в яких із сорбітолу утворюється

фруктоза сім'яної рідини для використання сперматозоїдами. Сорбітол унаслідок дуже повільного обміну в усіх тканинах, за винятком печінки, акумулюється за умов тривалої гіперглікемії, оскільки його проникність через мембрану клітин є низькою [60, 61]. Це один із механізмів, що пояснює, принаймні частково, клітинну токсичність діабетичної гіперглікемії, оскільки цей шлях активується, коли внутрішньоклітинна концентрація глюкози підвищена, а ці два ензими також змінюють свою активність і можуть бути мішеннями посилення розвитку діабетичних ускладнень. Найвищу активність цих ензимів виявлено у шваннівських клітинах периферійних нервів, епітелії кришталика, мозковому шарі нирок [58, 62].

У свою чергу, окисно-відновний дисбаланс NADH/NAD^+ призводить до пригнічення різних ензиматичних систем (у тому числі – системи глутатіону), що використовують NADPH , при цьому клітина може стати чутливою до ОС [42]. NADP також бере участь у біосинтезі біологічних молекул, таких як жирні кислоти та нітроген (II) оксиду, тому його зменшення або виснаження має шкідливий вплив для багатьох анаболічних шляхів. Підвищені рівні NADH можуть блокувати комплекс I електронно-транспортного ланцюга мітохондрій, що призведе до ще більшої продукції АФК. Крім того, надлишок NADH також може гальмувати гліколіз, піруватдегідрогеназний комплекс та цикл Кребса, що призводить до збільшення потоку глюкози через поліоловий шлях. З іншого боку, зниження NAD^+ також має згубний вплив на різні метаболічні шляхи. Основним з яких є сіртуїни, які відповідають за деацетилювання білка. Зниження NAD^+ інактивує сіртуїни, що призводить до надмірного ацетилювання білків і менш ефективний метаболізм глюкози. Більш того, підвищення синтезу NADH може сприяти утворенню кінцевих продуктів глибокого глікозилювання макромолекул (AGE) [63]. Внутрішньоклітинний вміст AGE посилюється за автоокиснення глюкози, утворення 3-дезоксиглюкозону, метилглюксалу та фрагментації гліцеральдегід-3-

фосфату, оскільки ці сполуки здатні реагувати з вільними аміногрупами внутрішньоклітинних і позаклітинних протеїнів, призводячи до їх модифікації [64]. Зв'язування AGE з RAGE індукує генерацію внутрішньоклітинних АФК і подальшу активацію редокс-чутливого регуляторного фактора транскрипції NF-κB. Разом з тим зміни експресії цього фактору може призводити до порушення регуляції експресії майже 500 різних генів, включаючи ензими, зокрема циклооксигеназу, 2, 5-ліпоксигеназу, та індукцибельну NO синтазу (iNOS), цитокіни (такі як інтерлейкін (IL) -1, IL-6, IL-8, хемокіни і фактор некрозу пухлини (TNF), молекули адгезії, регуляторні молекули клітинного циклу і ангіогенні фактори [65].

Більш того, AGEs що присутні в позаклітинному матриксі, знижують еластичність судин, пригнічують синтез нітроген (II) оксиду, що призводить до зниження ендотелійзалежної вазодилатації, підвищують рівень ендотеліну-1 (ET-1) [66]. Крім того, циркулюючі AGE можуть реагувати з ліпопротеїнами, особливо з ліпопротеїнами низької щільності (LDL), призводячи до структурних змін, які опосередковані LDL-рецепторами. Дійсно, ці продукти були ідентифіковані в атеросклеротичних бляшках, що вказує на можливу роль AGE в патофізіологічних ускладненнях серцево-судинної системи у пацієнтів хворих на діабет [63].

Активація гексозамінового шляху призводить до порушення функціонування судин, оскільки глюкоза може впливати на трансдукцію сигналу, транскрипційну активність, проліферацію клітин, апоптоз і протеасомну деградацію. У цьому шляху глюкоза перетворюється в глюкозамін-6-фосфат за участі глутамін-фруктозо-6-фосфатамідотрансферази. Глюкозамін-6-фосфат може бути активованим, метаболізується до уридиндифосфат-N-ацетилглюкозаміну, який за участі O-GlcNAc-трансферази використовується для глікозилювання деяких протеїнів, зокрема таких як фактори транскрипції, які, в свою чергу, регулюють експресію прозапальних і прокоагулянтних генів, таких як

інгібітор активатора плазміногену-І (*PAI-I*), молекула міжклітинної адгезії-І (*ICAM-I*), молекула судинної клітинної адгезії-1 (*VCAM-I*), порушення регуляції яких призводить до судинних ускладнень. Активація гексозамінового шляху також може інгібувати синтез eNOS, руйнувати субстрат інсулін-стимулюючого рецептору інсуліну (IRS) / фосфатидилінозитол 3-кіназу (PI3-K) / протеїн шляху кінази В (Akt), що посилює оксидативний стрес [67].

За хронічної гіперглікемії також підвищується вміст цитокінів, факторів росту, ендотеліну-І та ангіотензину II, які активують ізоформи РКС, зв'язуючись з рецепторами на поверхні клітин. Так, за діабету активуються декілька ізоформ РКС: РКСа, βI, βII, γ та δ. [68]. Активізація РКС, індукована гіперглікемією, також призводить до ушкодження судин, при цьому пригнічується експресія інсулінстимульованої ендотеліної NO-синтези (eNOS) в ендотелійних клітинах, знижується синтез нітроген (II) оксиду в клітинах гладеньких м'язів, що супроводжується підвищенням продукції ET-1. Це в свою чергу призводить до звуження судин і агрегації тромбоцитів, збільшення вмісту факторів росту, що спричиняють неоваскуляризацію та закупорювання капілярів внаслідок надекспресії протеїнів позаклітинного матриксу, при цьому збільшується експресія PAI-I і NF-κB та підвищується активність прооксидантного ензиму NADPH оксидази [69]. Тобто, при гіперглікемії активація РКС викликає підвищення експресії тих генів, продукти яких пошкоджують судини [70].

Ключовим регулятором множинних аспектів структури і функції кровоносних судин є фактор росту ендотелійних клітин судин. Проте останні дослідження показали, що VEGF також бере участь у нейродегенерації. Було виявлено, що знижені рівні VEGF викликають нейродегенерацію частково за рахунок порушення перфузії нервової тканини. Рівень VEGF впливає на тонус судин, контролюючи вивільнення нітроген (II) оксиду ендотелійними клітинами. Дисрегуляція сигналювання VEGF залучена в декілька нейропатологічних станів, таких як інсульт,

бічний аміотрофічний склероз, депресія, хвороба Альцгеймера, Паркінсона [71, 72]. За нейродегенеративних захворювань виникають порушення функцій судин, включаючи їх фіброз, відкладення аморфних субстанцій у стінці судин і потовщення базальної мембрани та екстрацелюлярного матриксу. Ці порушення призводять до звуження судин, втрати вазорегуляції, гіперперфузії, порушення дифузії кисню до нервової тканини. [73, 74].

У ссавців NO може генеруватися трьома різними ізоформами ензиму NO-синтази: нейрональними "nNOS (або NOS I), індукцйбельними" iNOS (або NOS II), і ендотелійними "eNOS (або NOS III). Всі ізоформи NOS використовують L-аргінін як субстрат, а молекулярний кисень і відновлений нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (NADPH) як коензими. Нейрональні NOS залучені до модулювання фізіологічних функцій, таких як навчання, пам'ять і нейрогенез [75]. У ЦНС nNOS опосередковує довготривале регулювання синаптичної передачі (довгострокове потенціювання, тривале інгібування), шляхом залучення NO, продукту нейрональної NO-синтази, як модулятора процесів нейротрансмісії. Вважають, що NO бере участь у регуляції артеріального тиску, шляхом інгібування активності nNOS у довгастому мозку та гіпоталамусі, тим самим, викликаючи системну гіпертензію. Порушення сигналювання NO, може призводити до розвитку різних нейродегенеративних патологій [76].

Існують дані, що гіперглікемія може призводити до розвитку апоптотичних процесів, шляхом посилення регуляції протеїну p53 та пригнічення регуляції транспортерів глюкози, GLUT1, 2 і 3, тим самим запускаючи мітохондріальний шлях загибелі клітин, посилюючи оксидативний стрес та стимулюючи експресію проапоптотичних протеїнів [45, 77]. Vincent та колеги показали, що гіперглікемія пов'язана із індукованою оксидативним стресом загибеллю нейронів та клітин Шванна через посилення активності каспази-3. Точний механізм, завдяки якому це відбувається при індукованому гіперглікемією апоптозі, не зрозумілий, але

показано, що гіперглікемія може підвищувати рівень АФК у нейронах гіпокампа, що, в свою чергу, призводило до підвищення внутрішньоклітинного кальцію у цих клітинах. Russell та колеги виявили надлишок мітохондріальних АФК внаслідок індукованої гіперглікемією деполяризації мітохондрійної мембрани, з подальшим зниженням рівня АТФ та збільшенням активності каспази-3 та 9, що призводить до каспазозалежного апоптозу. Таким чином, індукування діабету пов'язано із збільшенням співвідношення Вах/Bcl-2 та Вах/Bcl-xL, а також підвищенням активності каспази-3 [78].

За гіперглікемії відбуваються суттєві порушення в ЦНС, які здійснюються не тільки на рівні синаптичної передачі як показано нами раніше [14], але і на рівні розвитку дисфункцій клітин астроглії, таких як астроцити та олігодендроцити, а також на рівні різних модифікацій протеїнів та експресії їх генів. Показано, що астроцити є основними клітинами, які беруть участь у поглинанні глюкози. Астроцити є одним з типів гліальних клітин ЦНС, які також включають олігодендроцити, клітини Мюллера тощо [79]. Клітини астроглії забезпечують як структурну, так і функціональну підтримку нейронів (включаючи рециркуляцію нейромедіатора глутамату і вивільнення трофічного фактору, відіграють ключову роль в гомеостазі ЦНС, шляхом впливу на гематоенцефалічний бар'єр, запобігаючи надпродукції АФК, регулюючи активність нейронів та синаптичну передачу, концентрацію позаклітинного рН, іонів і нейромедіаторів, енергопостачання тощо) [80, 81]. Відомо, що астроцити володіють вищою антиоксидантною активністю, ніж нейрони. Астроцити містять високі рівні відновленого глутатіону та активності глутатіонпероксидази, що в свою чергу, є важливим фактором захисту ЦНС від ОС. Попередниками синтезу астроцитів є незрілі астроцити, в яких присутні в основному такі протеїни як нестин і віментин. При дозріванні астроцитів не відбувається експресія нестину, в той час як експресія гліального фібрилярного кислого протеїну стає більш вираженою, а ступінь

зниження експресії віментину залежить від періоду їх дозрівання. Зазвичай при ураженнях ЦНС, таких як травма, ішемія, пухлини, нейрозапальні та нейродегенеративні розлади, відбувається активація клітин астроглії, також відомої як реактивний гліоз або астрогліоз. У таких умовах реактивні астроцити стають високо позитивними для GFAP і віментину, а також вони експресують інтермедіальний протеїн - нестин [82]. Дослідження останніх років виявили декілька важливих функцій віментину. Було встановлено, що віментин приймає участь у функціонуванні ключових протеїнів, що беруть участь у міграції та клітинному сигналюванні. Його фосфорилування вважають є ймовірним механізмом регулювання цих функцій, що важливо для клітинної взаємодії та гомеостазу органів. Однак, механізми, що лежать в основі реорганізації віментину у відповідь на активні форми, повністю не вивчені. Зміни рівня експресії GFAP в головному мозку і сітківці тварин продемонстровано нами та іншими авторами за цукрового діабету [83, 84]. Відомо, що GFAP є специфічним для мозку. Рівень GFAP у крові у здорових людей дуже низький. Передбачається, що вивільнення GFAP з тканини мозку в кровотік може відбуватися внаслідок втрати структурної цілісності астроцитів шляхом некрозу та або механічного пошкодження та порушення проникності гематоенцефалічного бар'єру [85].

Розвиток діабетичної нейропатії (ДН) також супроводжуються уповільненням швидкості провідності нервів і за гострої фази захворювання навіть атрофією аксонів [86]. Не виключено, що ці дисфункції нервів за ДН можуть бути пов'язані з порушенням цитоскелету аксонів, за рахунок нейрофіламентів, оскільки вміст цих структурних протеїнів найбільший в аксонах. Відомо, що нейрофіламенти (NF) складаються з важких (NF-H), середніх (NF-M) і легких (NF-L) субодиниць, поділ на які оснований згідно їх молекулярної маси. Метаболічні або структурні порушення в одній або у всіх субодиницях нейрофіламентів можуть супроводжуватися змінами в мембранах аксонів, що буде призводити до втрати їх міцності, цілісності, і в кінцевому рахунку до їх розриву. Так, основною функцією NF-L є їх

відповідальність за пропорційне збирання триплетних субодиниць NF та підтримки діаметру аксонів. NF-M відіграють важливу роль в утворенні поперечних містків, стабілізації мережі філаментів та їх поздовжнього розширення. NF-H також беруть участь у формуванні поперечних містків і взаємодіють з мікротрубочками, мікрофіламентами та іншими елементами цитоскелету. Більше того, функції NF значно залежать від їх фосфорильованого стану. Вважають, що фосфорильовання NF-H і NF-M залучене в регуляцію проміжку між філаментами та діаметру аксонів. За умов фосфорильовання NF-H (pNF-H) ця субодиниця опосередковує взаємодію з іншими елементами цитоскелету, зокрема мікротрубочками. На даний час вважають, що порушення фосфорильовання NF у клітинах може бути загальною ознакою нейродегенеративних захворювань [87].

Серед різних нейрофіламентів pNF-H є відносно резистентним до протеолізу, тому він менше зазнає деградації в крові, ніж інші NF. Однак дисфункції аксонів можуть бути індуковані не тільки за рахунок NF, які виключно експресуються в нейронах, але й за участі інших протеїнів цитоскелету. [88].

У ряді нейродегенеративних станів виявлено підвищений рівень NF-L у крові, що є потенційним біомаркером пошкодження аксонів [89].

Відомо, що мієлінова оболонка є модифікованою плазматичною мембраною, яка спіралью обернена навколо аксону. Мієлінові мембрани є частиною Шванівських клітин у периферійній нервовій системі та олігодендрогліальних клітин у ЦНС. При цьому непокрита мієліном ділянка аксона є вузлами Ранв'є, які важливими для функціонування мієліну. Однак, за патологічних умов, зокрема нейродегенеративних захворювань, відбуваються суттєві порушення у мієліновій мембрані, яка містить основний протеїн мієліну, який, як вважають, є потенційним біомаркером захворювань ЦНС. Разом з тим МВР тісно пов'язаний з цитоскелетними протеїнами, такими як актин, тубулін, тау та асоційованим з мікротрубочками протеїн-2. За ДН пригнічується провідність нервів, що

може супроводжуватися змінами у мієліновій оболонці. Надмірне неензиматичне глікозилування основних компонентів мієліну периферійної та центральної нервової системи, індуковане ЦД, може призводити до порушення мієлінових мембран нейронів [90].

1.3. Реалізація механізмів дії вітаміну B₃ через NAD-залежні процеси

Відомо, що в клітинній біоенергетиці вирішальне значення в регуляції широкого спектру окисно-відновних реакцій відіграє співвідношення вільних NAD(P)/NAD(P)H пар, складовими якого є NAD, біологічне джерело NADP та їх відновлених форм. Основними шляхами біосинтезу NAD⁺ є синтез *de novo* з триптофану. Інший шлях біосинтезу з нікотинової кислоти з утворенням, нікотинамідаденінмононуклеотиду (NAMN), який за участі нікотинамідмононуклеотидаденілтрансферази (NMNAT) перетворюється в нікотинамідаденіндинуклеотид (NAAD⁺). На кінцевій стадії залишок нікотинової кислоти перетворюється в нікотинамід за допомогою глутамін-залежної NAD-синтетази (NADS) та синтезується NAD⁺. У випадку, коли попередником біосинтезу NAD⁺ є NAm або нікотинамідрибозид (NR) синтезується нікотинамідмононуклеотид (NMN) за участі нікотинамідфосфорибозилтрансферази (NAMPT) або нікотинамідрибозид-кінази (NRK) відповідно. На останньому етапі утворення NAD⁺ NMN знову конденсується з АТФ за участю ензиму NMNAT. Відомо, що є три ізоензими NMNAT 1, 2 і 3, що локалізовані в ядрі, цитоплазмі або мітохондріях. Показано, що збільшення активності NMNAT призводить до захисту аксонів у культивованих нейронах, які піддавали дегенерації Wallerian, за рахунок збільшення рівня ядерного NAD⁺, що призводило до активації NAD-залежного протеїну деацетилази SIRT1 [91, 92]. NAD⁺ та/або NADP⁺ є також ключовими коензимами численних оксидоредуктаз, зокрема лактатдегідрогенази, глутаматдегідрогенази. Перебіг численних метаболічних процесів залежить від NAD⁺, NADH або їх співвідношення. За нормоглікемічних умов основна

мета перетворення глюкози полягає у виробленні енергії - АТФ, а також у продукуванні NADPH та рибози пентозофосфатним шляхом. Надлишок глюкози може надалі зберігатися в організмі як глікоген або жирні кислоти. Оскільки метаболізм глюкози включає вилучення, зберігання та транспортування електронів, майже всі біохімічні реакції метаболізму глюкози - це фактично окисно-відновні реакції. Наприклад, розщеплення глюкози на 2 молекули пірувату під час гліколізу зберігає вилучені електрони в NADH, так як і складний шлях піруватдегідрогеназного комплексу, за допомогою якого піруват декарбоксілюється, утворюючи ацетил-СоА. Після введення ацетил-СоА у цикл Кребса, електрони накопичуються як у NADH, так і у FADH₂. Ці донори електронів потім передають свої електрони комплексу I (NADH) або комплексу II (FADH₂) електронно-транспортного ланцюга мітохондрій. Кисень використовується лише на останньому етапі, де комплекс IV транспортує електрони з цитохрому c до кисню. Надлишок NADH перевантажує комплекс I, чим більше електронів він транспортує, тим більше супероксидного аніону він буде продукувати. Це пов'язано з тим, що більше електронів може протікати через електронно-транспортний ланцюг та частково відновлювати кисень, що призводить до надпродукції супероксидного аніону, який є попередником всіх АФК.

Зовсім недавно почали досліджувати роль NAD⁺ в якості його некоензимних функцій. Зокрема, це NAD-залежна родина протеїнів деацетилаз - сіртуїнів (SIRTs), полі (ADP-рибозо)полімерази (PARPs) і споріднені аденозиндифосфат(ADP) -рибозилтрансферази (ARTs) і циклічна ADP -рибоза (cADPR), CD38 і CD157. Також важливим є транскрипційний корепресор CtBP, який взаємодіє з кількома клітинними і вірусними репресорами транскрипції, пригнічуючи експресію специфічних генів, що беруть участь у розвитку, регуляції клітинного циклу і клітинній трансформації. CtBP містить динуклеотидзв'язуючий домен, що нагадує складку Россмана. Приєднання NADH сприяє стабілізації димерної форми

CtBP. Вважається, що димерна форма має вирішальну роль для активності корепресора, оскільки вона забезпечує стабільну основу для зв'язування репресорів та їхніх мішеней. Зв'язування CtBP з репресорами-мішенями транскрипції посилюється NAD^+ і NADH , причому з NADH на три порядки більш ефективно [93].

NAD^+ є ко-субстратом у різних реакціях деацетилювання, що каталізуються сіртуїнами. Результати багатьох досліджень показали, що сіртуїни залучені у деацетилювання важливих протеїнів для клітинного гомеостазу, які регулюють широкий спектр процесів, що стосуються протеїнового, вуглеводного і ліпідного обміну, мітохондрійного гомеостазу і запрограмованих механізмів загибелі клітин, таких як апоптоз і аутофагія [94, 95]. Сіртуїни видаляють ацетильні групи із залишків лізину факторів транскрипції, гістонів, специфічних ензимів, включаючи Mn-супероксиддисмутазу і рецептор-коактиватор-1 α (PGC-1 α та інших протеїнів, які відіграють важливу роль в клітинному гомеостазі [96]. В результаті деацетилювання утворюються нікотинамід і рибоза 2'-0-ацетил-аденозин-дифосфат (АДР). Сіртуїни спочатку були охарактеризовані у дріжджах як регулятори тривалості життя. Родина сіртуїнів ссавців складається з семи членів, SIRT1–7. Їх каталітичний домен складається з 275 амінокислот і є загальним для всіх членів родини. Сіртуїни виявлені в нирках, печінці, селезінці, легенях, серці, м'язах, мозку, яєчках, яєчниках, тимусі, підшлунковій залозі, в жировій тканині. Їх локалізація змінюється в клітині, що призводить до різних фізіологічних і, можливо, патологічно-метаболічних ефектів за стресових умов. SIRT1 знаходиться як в ядрі, так і в цитоплазмі, а SIRT2 в основному виявляється в цитоплазмі, проте він може транспортуватися в ядро в залежності від клітинного циклу. SIRT3, -4 і -5 існують в мітохондріях. Останні два члена родини протеїнів сіртуїнів, SIRT6 і -7, знаходяться в ядрі та ядерці клітини відповідно [97]. SIRT1 є першим членом сіртуїнів, пов'язаних із старінням. Внаслідок цієї гомології початкові дослідження сіртуїнів ссавців були зосереджені переважно на

біології SIRT1. SIRT1 є найбільш вивченим членом родини сіртуїнів, ймовірно, через його вплив на клітинний цикл, метаболізм мітохондрій, енергетичний гомеостаз, запалення, оксидативний стрес та апоптоз [98]. SIRT1 може безпосередньо деацетилювати ядерні гістонові протеїни, що призводить до репресії транскрипції генів. З іншого боку, метаболічні ефекти SIRT1 залежать від деацетилювання негістонових протеїнів, таких як субстрат рецептора інсуліну 2, рецептор-коактиватор-1 α (PGC-1 α), рецептор, що активується проліфератором пероксисом (PPAR) - α , PPAR- γ , роз'єднувальний мітохондрійний протеїн-2 (UCP-2), фарнезоїд X-рецептор і стерол-регуляторний-елемент зв'язуючий протеїн. [99]. Завдяки своїй деацетилюючій активності SIRT1 регулює секрецію інсуліну, адіпогенез і міогенез.

SIRT 2 пов'язаний з процесом старіння та віковою нейродегенерацією. SIRT2 бере участь в контролі апоптозу шляхом регуляції процесу p53. Недавні дослідження показали, що SIRT2 може також діяти як промотор пухлини або супресор пухлини в пухлиногенезі, ймовірно, демонструючи регуляторну функцію. Крім того, SIRT2 бере участь у процесах обміну речовин, таких як адіпогенез, здатний деацетилювати глюкокіназу, важливий фермент для підтримки гомеостазу глюкози, що регулюється зв'язуванням регуляторного білка глюкокінази. SIRT3 пригнічує продукування мітохондріальних АФК, але також деацетилює та активує значну кількість мітохондріальних білків, регулюючи проліферацію, диференціювання та виживання клітин. Останні дані свідчать про те, що SIRT3 діє також як супресор пухлин, пригнічуючи гліколіз після деацетилювання і активації піруватдегідрогенази, тому роль SIRT3 у канцерогенезі є також дискусійною. Набагато менше відомо про інших членів родини SIRT. Активність деяких сіртуїнів не обмежується лише деацетилюванням протеїну. На відміну від інших членів сім'ї, SIRT4 не володіє NAD⁺-залежною деацетилазною активністю, але проявляє ADP-рибозилтрансферазну активність на гістони.

Зв'язок між NAD, NADH і активністю сіртуїнів вказує на те, що ця родина протеїнів функціонує деякою мірою як сенсор енергетичного статусу. Це може бути більш показовим у мітохондріях [101].

Процес ADP-рибозилування є важливою посттрансляційною модифікацією протеїнів (приєднання одного або декількох залишків ADP-рибози до протеїну), яка відіграє важливу роль у багатьох клітинних процесах, таких як передача сигналу, репарація ДНК, регуляція експресії генів та апоптоз. Як правило, джерелом залишків ADP-рибози служить NAD⁺. ADP-рибозилтрансферази каталізують реакції двох видів: моно-АДФ-рибозилування та полі-ADP-рибозилування. Розвиток ЦД та його ускладнень тісно пов'язаний із пошкодженням нуклеїнових кислот, внаслідок надпродукції АФК, та активацією процесів ADP-рибозилування ядерних протеїнів, що залученні до відновлення пошкоджених ДНК. Прооксидативні процеси можуть також спричиняти зміни посттрансляційної модифікації неядерних протеїнів, включаючи посилення їх моно-ADP-рибозилування. Цей процес змінює функціональні протеїни, а також інші протеїни, забезпечуючи основу для їх модифікації, регулюючи клітинні процеси [102]. Під час ензимного моно-ADP-рибозилування залишок ADP-рибози переноситься від NAD⁺ на специфічні амінокислотні залишки функціонально важливих клітинних протеїнів. Ендогенні екстрануклеарні ADP-рибозилтрансферази, які виявлені у багатьох клітинах та тканинах, каталізують моно-ADP-рибозилування аргінінових залишків G-протеїнів, модифікуючи їхні властивості та, відповідно, впливаючи на сигнальну трансдукцію.

Полі-ADP-рибозилування здійснюється за участю полі(ADP-рибозо)полімераз (PARP). Найпоширенішим та найдослідженішим хроматинасоційованим ензимом є полі(ADP-рибозо) полімераза 1 (PARP-1 EC 2.4.2.30). Субстратом для PARP-1 є NAD⁺, ADP-рибозу якого ензим використовує у процесі ковалентного приєднання залишків ADP-рибози до акцепторних протеїнів, які зазвичай асоційовані з ДНК (гетеромодифікація)

або до самої PARP-1 (автомоdifікація) [103]. PARP-1 проявляє високу каталітичну активність у присутності дволанцюгової ДНК, яка має вільні кінці або одониткові розриви.

Надактивація PARP призводить до специфічної запрограмованої загибелі клітин, що супроводжується виснаженням NAD^+ і АТР, змінами мітохондрійного мембранного потенціалу і вивільненням апоптозіндукуючого фактору. PARP-1 активується у відповідь на пошкодження ДНК. Ензим сприяє клітинній відповіді і репарації ДНК, беручи участь у процесі полі-ADP-рибозилування. PARP-1 також регулює транскрипцію, впливаючи на структуру хроматину, безпосередньо зв'язуючи ДНК, що призводить до змін експресії генів, модифікації хроматину або прямих взаємодій PARP-1 з іншими транскрипційними регуляторними протеїнами, які можуть бути активаторами чи ко-репресорами [104].

Головна функція цього ензиму полягає в забезпеченні ефективної репарації одностанцюгових розривів ДНК та ексцизійної репарації пошкоджених пуринових та піримідинових основ. При ензиматичному розщепленні глікозидного зв'язку між NAm та рибозою в молекулі NAD^+ залишки ADP-рибози зв'язуються із протеїнами-акцепторами та утворюють лінійні або розгалужені аніонні полімери [105]. Спочатку до γ -карбоксильної групи залишків глутамінової кислоти протеїнів-мішеней через утворення етерного зв'язку приєднується перший мономер ADP-рибози, далі мономери зв'язуються за рахунок глікозидних (1-2')-, рідше (1-2'')-зв'язків. У результаті утворюється ковалентно зв'язаний з протеїном полімер (від 2 до 200 ADP-рибозних одиниць), який може розгалужуватися через кожних 20-50 залишків ADP-рибози. Внаслідок приєднання одного залишку ADP-рибози до полімеру вивільняється молекула NAm , що включається в реакцію ресинтезу NAD^+ [106].

В останні роки багато видатних науковців та дослідницьких груп в галузі ендокринних захворювань приділяють увагу молекулярній генетиці

ЦД. Встановлено велику кількість мутацій та нуклеотидних поліморфізмів в генах, які відіграють важливу роль на різних етапах і шляхах, що беруть участь в метаболізмі глюкози, регуляції функціонування клітин підшлункової залози, а також клітин інших органів. Незважаючи на накопичення численних даних на молекулярному і клітинному рівнях, механізми розвитку діабету і його ускладнень досі не повністю досліджені. Безумовно, необхідні більш цілеспрямовані дослідження в цій галузі, які, в кінцевому підсумку, дозволять покращити діагностику, терапію та мінімізувати розвиток хронічних ускладнень [40].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та обладнання

У дослідженні використано щурів-самців лінії Wistar масою 170-270 г. Дослідження проведено без порушень загальноприйнятих біотичних норм гуманного поводження з лабораторними 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) [107]; Закон України “Про захист тварин від жорстокого поводження” № 3447-IV, 2006). Для дослідження використовували тканину підшлункової залози, мозку, нирок, сідничного нерву, ізольовані лейкоцити та сироватку крові. Сироватку крові одержували центрифугуванням цільної крові протягом 7 хв при 3000 g. До використання сироватку крові зберігали при -80 °C.

Серію досліджень було проведено також за умов *in vitro* на клітинних лініях RIN-m5F (ATCC®CRL-11605™) – β -клітини острівців Лангерганса (інсулінома) з щурів-самців *Rattus norvegicus*, EA.hy 926 - людська лінія ендотелійних клітин, отримана шляхом злиття HUVECs з лінією клітин A549 карциноми легенів людини.

Дослідження проведено із використанням наступних приладів: флуориметр FL800 (Biotek, США), установка для електрофорезу та електропереносу Mini-Protein III (Bio-Rad Laboratories, США), протоковий цитофлуориметр COULTER EPICS XL (Beckman Coulter, США), конфокальний мікроскоп Carl Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Німеччина), автоматичний лічильник клітин COUNTESS II FL, світлові мікроскопи Olympus BX 51 (Olympus, Японія) та Olympus CX41 light microscope (Olympus, Німеччина), іонізатор LabSonic M (Sartorius, Німеччина), автоматичний спектрофотометр μ Quant (Biotek, США), центрифуга Mikro 200R (Hettich, Німеччина), ваги електронні WPS 110/C/2 (RADWAG,

Польща), шейкер – термостат ES – 20 (BIOSAN, Німеччина), спектрофотометр СФ-46 (ЛОМО, Росія), ручний ротаційний мікротом Shandon Finesse 325 (Thermo Scientific, США), гомогенізатор Поттера та ін. Під час роботи було використано реактиви: стрептозотоцин (S0130, Sigma, США), нікотинамід (N0636, Sigma, США), N-GABA (Росія), anti-tubulin (ab6160, Abcam, Великобританія), anti-Lamin B1 (ab16048, Abcam, Великобританія), anti-VEGF (MABC595, Sigma, США), anti-SIRT1 (EB07400, Everest Biotech, Великобританія), anti-SIRT2 (ab67299, Abcam, Великобританія), anti-nNOS (ab1376, Abcam, Великобританія), anti-BAХ (B3428, Sigma, США), anti-vimentin (sc-373717, Santa Cruz Biotechnology, США), anti-NF-κB (SAB4501989, Sigma, США), anti-Neurofilaments (Santa Cruz Biotechnology, США), anti-MBP (PA5-79642, Invitrogen, США), anti-GFAP (sc-9065, Santa Cruz Biotechnology, США), та вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому anti-rabbit IgG (A6154, Sigma, США), anti-mouse IgG (A9044, Sigma, США), anti-rat IgG (A9037, Sigma, США), суміш інгібіторів протеаз (78443, Thermo Scientific, США), МТТ реагенту (Sigma, США), 2',7'-дихлорофлуоресцеїн діацетат (DCF, 35845, Sigma, США), tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate (TMRE, T87917 Sigma, США), Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP, C2759, Sigma, США), 5,5', 6,6'-тетраетилбензимідазол-карбоціаніновий йодид (JC-1, Molecular Probes, Invitrogen, США), Mitotracker CMX Ros (M7512, Invitrogen, США), пропідій йодид (PI, P4170, Sigma, США), флуоресцентний барвник Hoechst-33342 (Sigma, США), поживне середовище RPMI (R8005, Sigma, США), поживне середовище DMEM (Gibco, Invitrogen, США), натрій піруват (P2256, Sigma, США), суміш антибіотиків: 100 МО/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 0,25 мкг/мл амфотерицину (SV30079.01, HyClone), інактивована фетальна сироватка ВРХ (F7524, Sigma, США). Усі інші реактиви вітчизняного виробництва класу х.ч. та ч.д.а.

2.2. Моделювання експериментального ЦД 1 типу та схема введення похідного вітаміну В₃ та його кон'югату з ГАМК

Піддослідних щурів утримували на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до їжі та води. Експериментальний ЦД 1 типу у щурів індукували шляхом одноразового внутрішньочеревинного введення свіжоприготованого СТЗ у дозі 60 мг/кг, який розчиняли у 0,1 моль/л цитратному буфері, рН 4,5 [108]. Щурам контрольної групи внутрішньоочеревинно вводили 0,5 мл 0,1 моль/л цитратного буфера, рН 4,5. Через 6 тижнів індукції діабету тварини були розділені на групи – контрольна група щурів, діабетична група щурів та діабетична група щурів, яким вводили внутрішньочеревинно NAm або N-GABA у дозі 100 та 55 мг/кг, відповідно. Забір крові у тварин здійснювали вранці натщесерце із ретробульбарного венозного синусу ока, під легким ефірним наркозом. Рівень глюкози крові визначали за допомогою глюкометра “Accu-check” (Roshediagnostics, Швейцарія).

2.3. Виділення мітохондрій із головного мозку щурів

Головний мозок інтактних щурів швидко вилучали та гомогенізували в 0,32 моль/л сахарозі на 5 ммоль/л Трис-НСl буфері, рН 7,5 за допомогою гомогенізатора Поттера. Гомогенат центрифугували протягом 10 хв, 12000g для видалення ядер. Супернатант центрифугували протягом 20 хв, 23000g. Осад ресуспендували в 2 мл 0,32 моль/л сахарози та нашаровували на ступінчастий сахарозний градієнт. Синаптосоми виділяли методом диференційного центрифугування у градієнті густини сахарози згідно з методом J. P. Abita et al. [109]. Осад синаптосом піддавали осмотичному шоку холодної води при 1°С. Потім центрифугували 10 хв, 600-700g. Надосадову фракцію центрифугували при 1200 g 10 хв. Одержані мітохондрії використовували для з'ясування дії досліджуваних сполук (NAm 1 ммоль/л, СТЗ 0,01; 0,05; 1 ммоль/л). Для оцінки мітохондрійної дегідрогеназної активності проводили МТТ-тест [110].

2.4. Одержання препаратів лейкоцитів з периферичної крові щурів

Лейкоцити отримували в день експерименту з периферичної крові піддослідних тварин шляхом лізису еритроцитів. Щоб запобігти процесу згортання крові додавали гепарин. (50 МО). Гепаринізовану кров змішували з дистильованою водою та через 40 с додавали 1,8 % розчину NaCl. Зразки центрифугували 5 хв при 400 g для осадження лейкоцитів. Потім відбирали супернатант та двічі промивали осад фізіологічним розчином при центрифугуванні (400 g, 5 хв). Після цього осад ресуспендували до концентрації 2×10^6 кл/мл у фосфатному буфері PBS (Phosphate buffered saline, pH 7,4).

2.5. Оцінка перерозподілу між різними популяціями лейкоцитів

Використовуючи два параметри протокового цитофлуориметру COULTER EPICS XL (Beckman Coulter, США): розмір (за величиною прямого світлорозсіювання FS) та гранулярністю (за бічним світлорозсіюванням SS) оцінювали зміни у перерозподілі між двома основними типами лейкоцитів.

2.6. Оцінка рівня АФК та життєздатності лейкоцитів

За рівнем АФК у клітинах визначали наявність окислювального стресу, використовуючи 2',7'-дихлорофлуоресцеїн діацетат (DCF-DA) у кінцевій концентрації 25 мкмоль/л, згідно методики [111], де інтенсивність флуоресценції DCF є прямопропорційною вмісту АФК у клітинах. Інтенсивність флуоресценції зразків реєстрували за каналом FL1 (515-535 нм). Життєздатність клітин оцінювали за допомогою ядерного флуоресцентного зонду пропідій йодиду (PI) у концентрації 10 мкг/мл за каналом FL3. PI проникає лише у мертві клітини та ті, у яких пошкоджена цитоплазматична мембрана [112].

2.7. Визначення рівня мембранного потенціалу мітохондрій у лейкоцитах крові

Зміни мембранного потенціалу мітохондрій клітин, забарвлених етиловим етером тетраметилпродаміну (TMRE) у кінцевій концентрації 200 нмоль/л, визначали за допомогою проточного цитофлуориметру за каналом FL2 [113]. Для того, щоб досягти зниження мітохондрійного мембранного потенціалу клітини інкубували з CCCP (100 мкмоль/л) перед фарбуванням барвником TMRE (негативний контроль).

У дослідженні використовували протоковий цитофлуориметр COULTER EPICS XL (Beckman Coulter, США). Було проаналізовано 10000 подій з кожного зразку. Обробку даних проводили з використанням програми FCS Express V3.

2.8. Визначення концентрації протеїну

Концентрацію протеїнів визначали за поглинанням в УФ-області та за методом Лоурі. Визначення проводили на спектрофотометрі у кюветах з довжиною пробігу променю 1 см за допомогою спектрофотометру СФ-2000-02 (ОКБ Спектр, Росія), згідно методу [114]. Оптичну густину вимірювали при 280 та 320 нм, вміст протеїнів у зразку визначали за формулою: [протеїни, мг/мл] = (OD280 - OD320) x розведення [115].

2.9. Приготування лізатів тканин

До 100 мг подрібненої тканини мозку, яку розтирали у рідкому азоті або 100 мкл сироватки додавали 100 мкл лізуючого RIPA буферу (20 ммоль/л Tris-HCl, рН 7,6, 1 % Triton-X100, 150 ммоль/л NaCl, 50 ммоль/л NaF, 0,2 % натрій додецилсульфат, ДСН), суміш інгібіторів. Лізис тканини проводили протягом 30 хв на льоду. За допомогою іонізатора Lab Sonic M (Sartorius, ФРН) проводили руйнування мембран. Процедуру проводили двічі (Cycle 0.8, Ampl. 50 %) по 20 с. Лізати центрифугували протягом 30 хв при 12000 g. Надалі відбирали надосадову рідину (інтерфазу), до якої

додавали 5-кратний Лемлі буфер (60 ммоль/л Tris-HCl pH 6,8, 2 % ДСН, 10 % гліцерин, 5 % β -меркаптоетанол, 0,01 % бромфеноловий синій) та кип'ятили на водяній бані протягом 5 хв. Зразки зберігали при -80°C .

2.10. Електрофорез протеїнів у ПААГ

Електрофоретичне розділення протеїнів проводили у 8-10 % поліакриламідному гелях (ПААГ), в присутності натрій додецилсульфату в буферній системі Лемлі для подальшого вестерн-блот аналізу згідно методики [116]. Зразки тканинних лізатів вирівнювали за концентрацією протеїну, як правило β -актини чи тубуліни, та прогрівали 5 хв при 95°C . Електрофорез проводили в буфері pH 8,3 (25 ммоль/л Tris-HCl, 192 ммоль/л гліцину, 0,1 % ДСН) в режимі 0,03 мА протягом 3-4 годин, використовуючи камеру для електрофорезу Mini-PROTEAN II (BIO-RAD, Швеція). Для визначення молекулярної маси протеїнів використовували протеїнові стандарти фірми Thermo Scientific (США).

2.11. Вестерн-блот аналіз протеїнів

Вестерн-блот аналіз протеїнів проводили згідно методу [117], який ґрунтується на перенесенні протеїнів під дією електричного струму з поліакриламідного гелю (ПААГ) на нітроцелюлозну мембрану, яку потім інкубують з відповідними антитілами. Імунореактивні зони виявляють за допомогою реакції хемілюмінесценції. Блотинг протеїнів на мембрану (GE10600003 Amersham™ Protran, Premium Western blotting membranes, nitrocellulose pore size) проводили в апараті Mini Trans-Blot Cell (BIO-RAD, Швеція) при напрузі 250 мА протягом 90 хв у буфері для преносу (25 ммоль/л Tris-HCl, pH 8.3, 20 % метанол, 192 ммоль/л гліцин, 0,1 % ДСН). Після цього мембрани промивали дистильованою водою та фарбували 1 % розчином барвнику Ronsseau S, приготовленого на 3 % ТХУ протягом 5-10 хв. Потім проводили блокування вільних центрів зв'язування на мембрані при 37°C протягом 1 год 5 % сухим знежиреним молоком (20-241, АРЕХ

Research, Inc.) у буфері PBS із додаванням 0,1 % Tween 20. Після цього мембрану інкубували з відповідними первинними антитілами у буфері для блокування протягом 12 год при 4 °С з наступним промиванням PBSt 6 разів по 7 хв. Використовували вторинні антитіла анти-мишачі або анти-кролячі IgG, кон'юговані з пероксидазою хрому в розведенні 1:1000 або 1:10000, відповідно у буфері для блокування. Інкубацію з вторинними антитілами здійснювали протягом 2 годин при 37°, після чого мембрану також відмивали PBSt. Імунореактивні смуги на блотах виявляли при використанні 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-НСl (рН 8,5). Час експозиції оброблених мембран на рентгенівській плівці тривав від 1 до 20 хв. в залежності від інтенсивності хемілюмінесценції. Для проявлення 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 програмного забезпечення TotalLab TL120 (Nonlinear Inc, США), вміст протеїну виражали в умовних одиницях (ум. од.).

2.12. Приготування безпротеїнових екстрактів тканин

Для приготування кислотних екстрактів одразу після декапітацій тварин тканину швидко заморожували в ступці з рідким азотом і розтирали до порошкоподібного стану [118]. Розтерту тканину 1 г поміщали до центрифужної пробірки, що містила 7 мл 6% охолодженої HClO_4 (розведення 1:7), інтенсивно перемішували 1-2 хв та ставили на +4°C. Через 30 хв отримані кислотні екстракти центрифугували при охолодженні 15-20 хв при 5500 g. Потім отриманий екстракт нейтралізували на холоді 49% КОН до рН 6,5. Залишали при 4°C на 30-60 хв для осадження KClO_4 , після

чого екстракти були придатні для досліджень. Центрифугували 20 хв при 5500 g/хв. В супернатанті визначали вміст метаболітів.

2.13. Ензиматичне визначення метаболітів, активності ензимів та співвідношення вільних NAD^+/NADH , $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ пар.

Вміст NAD^+ , метаболітів, активності ензимів, а також розрахунок співвідношення вільних NAD^+/NADH , $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ пар, з урахуванням концентрації відповідних метаболітів та констант рівноваги дегідрогеназ, визначали згідно методів [118]. Ензиматичні методи визначення вмісту метаболітів та коензимів в кислотних депротейнізованих екстрактах тканин щурів ґрунтовані на відновленні NAD^+ або окисненні NADH у відповідних дегідрогеназних реакціях та реєстрації змін оптичної густини на спектрофотометрі. Спочатку вимірювали початкову екстинцію проб, після цього вносили безпосередньо в контрольну і дослідну кювети певну кількість ензиму для ініціювання реакції. Кількість ензиму підбирали так, щоб вона була достатньою для повного завершення реакції через 15-20 хв. За сталих змін, які свідчили про закінчення реакції, значення оптичної густини використовували для розрахунку вмісту досліджених метаболітів згідно формули:

$$X(\text{мкмоль}/1 \text{ г тканини}) = \frac{\Delta E \cdot P \cdot V}{\epsilon \cdot \alpha \cdot d}$$

ΔE - різниця оптичної густини; P – розведення проби; V – об'єм реакційної суміші, мл; ϵ - коефіцієнт молярної екстинції, при довжині хвилі 340 нм - 6,22 $\text{см}^2/\text{мкмоль}$; α - об'єм екстракту, що внесли в кювету, мл; d – довжина світлового шляху в кюветі, 1 см.

На основі визначених концентрацій метаболітів та констант відповідних дегідрогеназ визначали співвідношення вільних NAD^+/NADH , $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ пар:

$$\text{NAD}^+/\text{NADH} = \frac{\text{піруват}}{1,1 \cdot 10^{-4} \cdot \text{лактат}}$$

$$\text{NADP}^+/\text{NADPH} = \frac{\text{піруват} \cdot 1,16 \cdot 10^{-3}}{3,44 \cdot 10^{-2} \cdot \text{малат}}$$

2.14. Гістологічна оцінка стану підшлункової залози

Після вилучення та очистки від залишків жирової тканини підшлункову залозу фіксували 10 % розчином формаліну на 0,1М фосфатному буфері, рН 7,4, зневоднювали у висхідних концентраціях етанолу і заливали у парафін за стандартної методики. Парафінові зрізи товщиною 6-8 мкм профарбовували гематоксилін-еозином [119].

Морфометрична оцінка. Мікрофотографії отримували на мікроскопі Olympus BX 51. Морфометричний аналіз проведено за допомогою програмного забезпечення Carl Zeiss (AxioVision SE64 Rel.4.9.1), збільшення $\times 400$ (Об. 40, ок. 10).

2.15. Гістологічна оцінка стану сідничного нерва

Зразки сідничного нерва досліджуваних щурів ретельно виділяли без пошкодження судин і потім фіксували в нейтральному буфері (10% формалін, PBS, рН 7,4). Зразки після фіксації розсікали на поздовжніх кріосекціях товщиною 15 мкм з використанням методу кріохірургії, що дозволяє виявляти нервові волокна, оцінювати наявність і морфологію осьового циліндра і контур мієлінової оболонки, ідентифікувати ядра клітин Швана, стромальних елементів нерва. Кріосекції просочували нітратом срібла. Елементи нервової структури далі вивчали за допомогою скануючої електронної мікроскопії (SEM). Зразки фіксованого нерва поміщали в етанол до повного випарювання останнього. Ці висушені зразки покривали золотом товщиною 15 нм, використовуючи пристрій 682 Gatan PECS. Проведені дослідження мікрофотографії SEM на TescanMira [120].

Кількісні зміни оцінювали за допомогою морфометричного методу. Для цього гістологічні мікропрепарати фотографували при збільшенні окуляра мікрометра $\times 400$ та $\times 1000$. За формулою кількість волокон у зоні тестування виражали в співвідношенні одиниць щільності, мм²/ тест-зон:

$$\text{Щільність нервового волокна} = \frac{N \times 10^6}{T \times 170}$$

N – кількість нервових волокон; T – товщина мікропрепаратів (15 μ); 170 – довжина тестової зони (170 μ)

Морфометричний аналіз проводили з використанням мікроскопа Olympus BX 51 і програмного забезпечення CarlZeiss (AxioVision SE64 Rel.4.9.1) з збільшенням $\times 400$.

2.16. Імуногістохімічний аналіз мозку

Мозок фіксували 4 % розчином параформальдегіду, відмивали фізіологічним розчином та переносили в етиловий спирт зростаючої концентрації (70 % та 96 %) з наступною дегідратацією й заливкою у парафінові блоки. З використанням кріомікротому отримували зрізи (6-12 мкм) та фіксували на адгезивних скельцях в абсолютному етанолі протягом 60 секунд при температурі +4° С та льодяному ацетоні протягом 10 хв. Скельця висушували на повітрі та промивали буфером PBS. Активність ендогенної пероксидази інактивували шляхом інкубації зразків у розчині 10 % метанолу та 0,5 % гідроген пероксиду протягом 15-20 хв при кімнатній температурі. Зрізи блокували в 3 % розчині БСА-PBSt протягом 60 хв при кімнатній температурі. Після цього інкубували з анти-GFAP антитілами або анти-NF у розведенні 1:200 в PBSt протягом 18 год при +4°С. Зрізи промивали 3-4 рази за допомогою PBSt та інкубували протягом 60 хв при кімнатній температурі з вторинними антитілами. Контроль неспецифічного зв'язування вторинних антитіл було виконано згідно цього ж протоколу, за винятком первинних антитіл. Після промивання зрізи фарбували

флуоресцентним барвником Hoechst-33342 для візуалізації клітинного ядра. Результати імунофлуоресценції були оцінені за допомогою мікроскопа Carl Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Німеччина) та були оброблені за допомогою програмного забезпечення Zeiss ZEN [121].

2.17. Визначення рівня альбуміну

Рівень альбуміну у добовій сечі визначали за допомогою імуноензимної тест-системи “Альбумін-ІФА” вітчизняного виробництва (м. Харків).

2.18. Культивування клітин лінії RIN-m5F

Клітини лінії RIN-m5F (β -клітини острівців Лангерганса (інсулінома) з щурів-самців *Rattus norvegicus*) культивували у поживному середовищі RPMI (R8005, Sigma, США) із додаванням 1 ммоль/л натрій пірувату (P2256, Sigma, США), суміші антибіотиків: 100 МО/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 0,25 мкг/мл амфотерицину (SV30079.01, HyClone) та 10 % інактивованої фетальної сироватки ВРХ (F7524, Sigma, США) за стандартних умов (5 % CO₂, 100 % вологість, 37 °C). Пасажування клітин RIN-m5F здійснювали у співвідношенні 1:3 – 1:4 кожні 2-3 доби при досягненні ними конфлюентності 80-90 %. За допомогою автоматичного лічильника Countess II FL підраховували кількість клітин та оцінювали інтенсивність росту культури клітин.

2.19. Оцінка життєздатності клітин RIN-m5F за допомогою МТТ-тесту

Оцінку життєздатності клітин проводили за допомогою МТТ-тесту згідно методики [122] у власній модифікації. Метод полягає у відновленні мітохондрійними і частково цитоплазматичними дегідрогеназами тетразолієвого барвника МТТ до МТТ-формагану, інтенсивність якого відображає ступінь життєздатності клітин. Клітини розсіювали у 96 лункові

планшети (655 950, Greiner, Німеччина) у концентрації $2,5 \times 10^5$ кл/см³ у середовищі RPMI-1640 (R8005, Sigma-Aldrich), з додаванням 1 ммоль/л пірувату (S8636, Sigma-Aldrich) та 10 % фетальної сироватки ВРХ та культивували 24 год за стандартних умов (5 % CO₂, 100 % вологість, 37 °C). Потім відбирали середовище, клітини промивали PBS та вносили у лунки по 0,1 мл середовища RPMI-1640, з додаванням 1 ммоль пірувату, без фетальної сироватки та додавали високу концентрацію глюкози (100 ммоль/л) на 24 год з метою моделювати стан гіперглікемії. За 24 год перед вимірюванням вносили NAm в концентрації 1 ммоль/л та культивували за стандартних умов. Після цього культуральне середовище відбирали і замінювали на нове із додаванням МТТ реагенту (Sigma-Aldrich, США) та інкубували протягом 4 годин за стандартних умов. Потім клітини осаджували, обережно відбирали середовище, додавали по 0,1 мл диметилсульфоксиду (ДМСО) та інкубували ще 5 хвилин за умов інтенсивного струшування. Оптичне поглинання розчину вимірювали при довжинах хвиль 560 нм та 630 нм.

2.20. Визначення рівня АФК та мембранного потенціалу мітохондрій на клітинній лінії RIN-m5F

Клітини в концентрації $2,5 \times 10^5$ кл/см³ нарощували у 12-лунковому планшеті до конфлюентного стану (90 %). Інкубацію з високою концентрацією глюкози проводили протягом 24 год. NAm вносили на 24 години, у кінцевій концентрації 1 ммоль/л. По закінченню терміну інкубації відбирали середовище з лунок та вносили 200 мкл 0,25% трипсину, через 1 хв його дію інгібували, додаючи 400 мкл середовища з фетальною сироваткою ВРХ. Після цього клітини переносили у мікропробірки типу епендорф (1,5 мл), додавали 500 мкл PBS та осаджували при 400 g, 5 хв. Відбирали надосадову рідину та додавали по 1000 мкл PBS і знову осаджували при 400 g 5 хв. Відібрали надосадову рідину та додали 1000мкл

PBS, ресуспендували та відібрали по 500 мкл у 2 пробірки для визначення оксидативного стресу та мембранного потенціалу мітохондрій.

Для оцінки рівня АФК у пробірки вносили 2',7'-дихлорофлуоресцеїн діацетат (DCF-DA) (35845, Sigma-Aldrich) у кінцевій концентрації 25 мкмоль/л та інкубували протягом 30 хв. Потім осаджували клітини, відбирали надосадову рідину та вносили 500 мкл PBS [111]. Інтенсивність флуоресценції DCF-DA прямопропорційна вмісту АФК у клітинах. Інтенсивність випромінювання зразків реєстрували за каналом FL1 (515-535 нм).

Для визначення мембранного потенціалу мітохондрій у пробірки, які містили до 500 мкл суспензії клітин, вносили етиловий етер тетраметилпродаміну (TMRE, "Molecular probes", США) у кінцевій концентрації 200 нмоль/л та інкубували 30 хв. Визначали флуоресценцію на проточному цитофлуориметрі за каналом FL2 [113]. Для того, щоб досягти повної деполаризації мітохондрійного мембранного потенціалу, клітини інкубували з CCCP (100 мкмоль/л) перед фарбуванням барвником TMRE (негативний контроль).

2.21. Культивування клітин лінії EA.hy926

Клітини EA.hy926 – людська лінія ендотелійних клітин, отримана шляхом злиття HUVECs з лінією клітин A549 карциноми легенів людини, інкубували в середовищі DMEM з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки (Gibco Invitrogen), антибіотиків (пеніцилін 100 од / мл та стрептоміцин 50 мкг / мл, Sigma) при 37 °C в CO₂-інкубаторі з 5%-м вмістом CO₂ та за 100%-ї вологості. Клітини інкубували за фізіологічних (5ммоль/л глюкози) або гіперглікемічних (30 ммоль/л глюкози) умов протягом 24 год, а потім з нікотинамідом (NAm, 1 ммоль/л, 0,1 ммоль/л) протягом такого ж терміну.

2.22. Візуалізація мітохондрій клітин EA.hy926

Для візуалізації мітохондрій клітини були вирощені на покривних скельцях, їх навантажували 100 нмоль/л Mitotracker CMX Ros (Invitrogen, San Diego, CA, USA) протягом 20 хв при кімнатній температурі. Після промивання клітин в поживному середовищі і в PBS, клітини фіксували 4% розчином параформальдегіду і знову промивали PBS. Потім клітини на скельцях були внесені в Glycergel Mounting Medium (Dako Cytomation), що містила барвник DAPI для фарбування ядер. Для візуалізації мітохондрій використовували конфокальний мікроскоп фірми Zeiss Spinning Disc Confocal Microscopy [123].

2.23. Визначення мембранного потенціалу мітохондрій на клітинній лінії EA.hy926

Мітохондрійний мембранний потенціал вимірювали флуориметрично з JC-1 (5,5', 6,6'-тетраетилбензимідазол-карбоціаніновий йодид, Molecular Probes, Invitrogen). Клітини, які вирощували в 24-лунковому планшеті, інкубували в поживному середовищі з 5 мкмоль/л барвником JC-1 при температурі 37 °C в темряві протягом 15 хвилин. Далі клітини промивали тричі в поживному середовищі і тричі в PBS. Потім додавали 0,5 мл PBS в кожен лунку. Для того, щоб досягти повного розсіювання мітохондрійного мембранного потенціалу клітини інкубували з валіноміцином (2 мкг/мл) і CCCP (5 мкмоль/л) перед фарбуванням барвником JC-1 (негативний контроль). Флуоресценцію JC-1 вимірювали з використанням лазерної скануючої цитометрії (iCYSCompuCyte) з аргонним лазером (збудження 488 нм). Дані були представлені як співвідношення значень флуоресценції помаранчевого до зеленого кольору, що представляють повністю заряджені і незаряджені мітохондрії, відповідно [123].

2.24. Статистична обробка результатів

Для статистичної обробки використовували програми MS Excel та Origin 7.5. Достовірність відмінностей між групами порівняння оцінювалася методом однофакторного дисперсійного аналізу (one way ANOVA) з подальшим тестом Tukey (post-hoc test). Результати представлені у вигляді середнього значення (M) і стандартної помилки середнього значення ($\pm m$). Різницю вважали статистично достовірною при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3. ПОКАЗНИКИ РОЗВИТКУ ПАТОГЕНЕТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ ЗА ЦД 1 ТИПУ ТА ЗА ДІЇ НА ЙОГО ТЛІ NAM ТА N-GABA

3.1. Показники, які характеризують розвиток ЦД 1 типу

На даний час серед широкого спектру фармакологічних антидіабетичних препаратів для запобігання та лікування ЦД та його ускладнень, які використовуються в клініці, все більше уваги приділяється використанню природних сполук. Для з'ясування механізмів дії вітаміну B₃ наша увага також була зосереджена на його кон'югаті нікотинової кислоти з гамма-аміномасляною кислотою - нікотиноіл-ГАМК (N-GABA). Цукровий діабет є найбільш поширеним захворюванням у людей та клінічно характеризується гіперглікемією, що запускає цілий каскад патологічних процесів. Тому для валідації експериментальної моделі ЦД 1 типу доцільно було оцінити рівень глюкози в крові піддослідних тварин. На початку проведення експериментів рівень глюкози крові та маса тіла тварин були практично однакові у всіх досліджуваних групах (табл. 3.1). Наприкінці експерименту рівень глюкози у діабетичній групі становив 23,3±3,0 ммоль/л, тобто збільшився у 5 разів порівняно з контрольною групою, тоді як у контрольній групі він залишився без змін. При введенні діабетичним щурам нікотинамідом достовірних змін рівня глюкози не було виявлено (табл. 3.1), введення нікотиноіл-гамма-аміномасляної кислоти призводило до незначного зниження цього показника (в 1,57 рази порівняно з діабетичною групою). Це може бути пов'язано з тим, що N-GABA як і ГАМК в α-клітинах індукує гіперполяризацію мембран та пригнічує секрецію глюкагону [124-126], тоді як в острівцевих β-клітинах він викликає деполяризацію мембран і призводить до збільшення секреції інсуліну. Крім того, дія ГАМК на β-клітини супроводжується стимуляцією проліферації клітин, а також запобігає розвитку апоптозу, що обґрунтовує можливість її застосування для лікування діабету. [127]. Існують також дані щодо ролі ГАМК в індукуванні безперервного перетворення α-клітин у β-подібні

клітини, що супроводжується збільшенням кількості β -клітин. Тривале застосування ГАМК призводить до значного збільшення розміру і кількості острівців за рахунок β -подібної гіперплазії клітин. Вважають, що саме гіперплазія залежить від дози та тривалості лікування ГАМК. ГАМК здатна індукувати перетворення α -клітин у β -подібні клітини, регулюючи експресію Arx, причому ГАМК діє через рецептор GABA_A, розташований на α -клітинах. [128, 129]. Це викликає запуск механізмів, які призводять до заміщення α -клітин, що включають мобілізацію клітин-попередників, які повторно запроваджують програму ендокринної диференціації, як це спостерігається під час розвитку підшлункової залози, такі α -клітини згодом перетворюються на β -подібні клітини при тривалому впливі ГАМК. Важливо зазначити, що регеновані β -подібні клітини функціональні і можуть неодноразово змінювати наслідки хімічно індукованої загибелі β -клітин, навіть у важко діабетичних тварин. Важливим є те, що трансплантовані острівці людини з ГАМК призводять до зменшення кількості α -клітин, що супроводжується супутнім збільшенням кількості β -подібних клітин, що свідчить про здатність перетворення α -до- β -клітин. Це може сприяти пошуку шляхів цільової терапії для відновлення маси β -клітин за діабету 1 і 2 типів. Тривале застосування ГАМК призводить до значного, але контрольованого, збільшення кількості інсуліноутворюючих клітин [130].

Як свідчать представлені дані, таблиця 3.1, через 8 тижнів розвитку ЦД 1 типу маса тіла діабетичних щурів зменшилася на 33,53 % порівняно з контрольною групою. Введення діабетичним щурам нікотинамідю та нікотиноїл-гамма-аміномасляної кислоти протягом 14 діб не призводило до зростання маси тіла тварин порівняно з діабетичною групою (табл.3.1).

Таблиця 3.1. Маса тіла та рівень глюкози в крові щурів, $M \pm m$ ($n = 3-4$)

Показник Група	Маса тіла, г, початкова	Глюкоза, ммоль/л, початкова	Маса тіла, г, В кінці 8-го тижня	Глюкоза, ммоль/л, в кінці 8-го тижня
Котроль	227,5 ± 20,2	4,7 ± 0,5	311,7 ± 18,3	4,2 ± 0,7
Діабет (Д)	211,2 ± 17,3	4,7 ± 0,5	207,2 ± 15,3*	23,3 ± 3,0*
Д+NAm	207,5 ± 15,4	4,7 ± 0,5	204,3 ± 12,4*	21,9 ± 4,7*
Д+N-GABA	212,1 ± 11,2	4,7 ± 0,5	217,1 ± 10,2*	14,8 ± 3,5*#

Примітки: * $P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”; # $P < 0,05$ порівняно з групою “Діабет”

3.2. Структурно-морфологічний стан підшлункової залози за ЦД 1 типу

Цукровий діабет є не тільки результатом генетичної схильності, але й нерідко до його розвитку призводять як ендogenous метаболічні порушення та екологічні фактори зовнішнього середовища, які призводять до відносної або абсолютної відсутності секреції інсуліну або стійкості до його дії навіть на клітинному рівні [131]. Слід зазначити, що хронічна гіперглікемія є ознакою захворювання на діабет, який, за порушень обміну речовин, проявляється у змінах рівня глюкози натщесерце, толерантності до глюкози та гіперплазії, що, в свою чергу, може призвести до розвитку дисфункцій ендотелію судин [132]. Порушення метаболізму глюкози в організмі також призводить до дисфункцій острівців Лангерганса, що супроводжується втратою β -клітин і зниженням секреції інсуліну, що виникає як наслідок цукрового діабету та гіперглікемії [133]. Крім того, втрата маси та/або функції β -клітин, викликана гіперглікемією, призводить до зниження диференціації β -клітин [134]. Такі зміни, як вважають, також пов'язані з дисфункціями обміну ліпідів і протеїнів [135,136].

Високий рівень глюкози крові може призводити до функціональних та структурних змін у різних органах. Не виключено, що зміни відбуваються і в підшлунковій залозі. Для моделювання експериментальної моделі ЦД 1 типу на щурах був використаний стрептозотцин, який специфічно

викликає загибель β -клітини підшлункової залози [137]. Одним із найважливіших механізмів загибелі цих клітин, є алкілювання їх ДНК. Початкове перенесення метильної групи з стрептозотоцину до молекули ДНК β -клітин ініціює ланцюг подій, що призводить до фрагментації і руйнування ДНК. Руйнування ДНК активізує додатковий механізм, який далі підвищує токсичну дію стрептозотоцину. А саме, пошкодження ДНК активує полі-ADP-рибозополімераза-1 (PARP-1), яка в даному випадку надактивується і зменшує клітинний пул NAD^+ та запаси АТФ. Зниження вмісту АТФ у β -клітинах, в свою чергу, призведе до їх некрозу. А стрептозоточиніндуковане NAD^+ -виснаження призводить до інгібування біосинтезу та секреції інсуліну. [138]. Тому важливо було оцінити стан підшлункової залози за ЦД 1 типу. Для цього було проведено гістологічне дослідження зрізів підшлункової залози піддослідних тварин. Відомо, що підшлункова залоза має складну альвеолярну будову. Приблизно 95 % залози займає екзокринний компонент, який представлений ацинусами. Ендокринний компонент представлений у вигляді панкреатичних острівців Лангерганса. Панкреатичні острівці умовно поділяють на малі, середні та великі в залежності від об'єму острівця [139]. Незважаючи на те, що методом профарбовування гематоксил-еозином не можна диференціювати популяції панкреатоцитів, проте можна оцінити загальний характер структурних змін. За результатами наших досліджень було виявлено, що підшлункова залоза інтактних щурів структурно незмінена, лише зустрічаються поодинокі ушкоджені ациноцити і панкреатоцити (Рис. 3.1). У діабетичних тварин виявлено морфологічні зміни в підшлунковій залозі: екзокринна складова залози без ознак структурних змін, але в острівцях Лангерганса спостерігається значна кількість ушкоджених панкреатоцитів в стані набряку та вогнищового ураження. За введення NaN протягом двох тижнів було виявлено набряк поодиноких панкреатоцитів, ацинуси залози були неушкоджені. Відомо, що нікотинамід є інгібітором PARP-1, що

призводить до підвищення клітинного пулу NAD^+ та збільшення запасів АТР, що може бути одним із пояснень його позитивної дії [140].

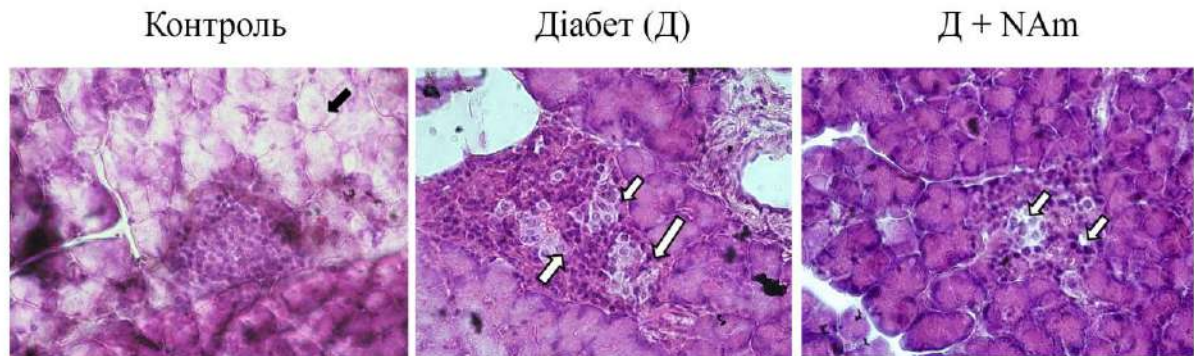




Рисунок 3.1. Гістологічні зміни підшлункової залози щурів. Пофарбовано гематоксилін-еозином ($n=4-5$)

Примітка:  гіпохромні ацинуси.  ушкоджені панкреатоцити з набряком цитоплазми.

3.3. Дія NAm та N-GABA на життєздатність, рівень АФК та мембранний потенціал мітохондрій лейкоцитів периферичної

Високий рівень глюкози в крові також може призводити до запальних процесів, у розвитку яких важливу роль відіграють лейкоцити, які є важливими компонентами імунної системи людини. Існує два типи лейкоцитів: гранулоцити (нейтрофіли, еозинофіли, базофіли) та агранулоцити (лімфоцити, моноцити), які відрізняються за своїм походженням, морфологією та функціональними властивостями. Лейкоцити здійснюють неспецифічний захист організму людини від патологічного впливу агентів екзогенного і ендогенного походження. У процесі загострення запальних процесів лейкоцити і самі гинуть у величезній кількості [141, 142]. За даних експериментальних умов нами було оцінено життєздатність лейкоцитів крові і показано, що розвиток ЦД 1 типу призводить до зниження кількості живих лейкоцитів у крові тварин у 4,65 рази порівняно з контрольною групою тварин (Рис.3.5). На нашу думку, загибель клітин може бути спричинена, частково, активацією апоптозу. За ЦД відбувається активація процесів полі-ADP-рибозилування. Пригнічення цих процесів може запобігати загибелі досліджуваних клітин крові.

Застосування NAm або N-GABA при їх двотижневому введенні призводило до пригнічення загибелі лейкоцитів крові, оскільки життєздатність досліджуваних клітин підвищувалася у 2,85 та 1,52 рази порівняно з групою діабетичних тварин, відповідно. Причому NAm справляв більш виражений ефект на життєздатність клітин у порівнянні з N-GABA. Коригувальний ефект NAm або N-GABA на даний показник може здійснюватися за рахунок підтримання клітинного пулу NAD^+ [13], який, як відомо, необхідний для автоімунних процесів, синтезу інсуліну, а також, через пригнічення NAD -залежного деацетилювання p53, що спричиняється $\text{sig}2\alpha$.

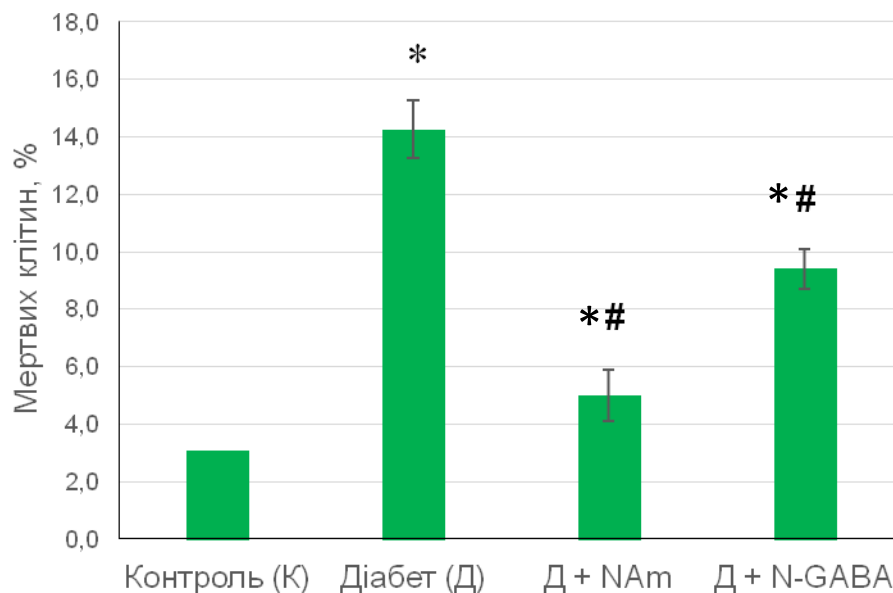


Рисунок 3.2. Життєздатність лейкоцитів крові щурів за умов ЦД 1 типу ($n = 4-5$), $*P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”; $\#P < 0,05$ порівняно з групою “Діабет”

У свою чергу, знижена життєздатність лейкоцитів може супроводжуватися порушеннями у гемопоетичній системі та призводити до змін у перерозподілі між їхніми двома основними типами. Дійсно, було показано, що кількість гранулоцитів у крові за ЦД 1 типу збільшується у 2,25 рази порівняно з контрольною групою щурів. Введення NAm або N-GABA призводило до зниження їхньої кількості у 1,28 та 1,57 рази порівняно з групою діабетичних тварин, відповідно для досліджуваних

сполук, та відновлення рівноваги між кількістю гранулоцитів та агранулоцитів (Рис. 3.3).

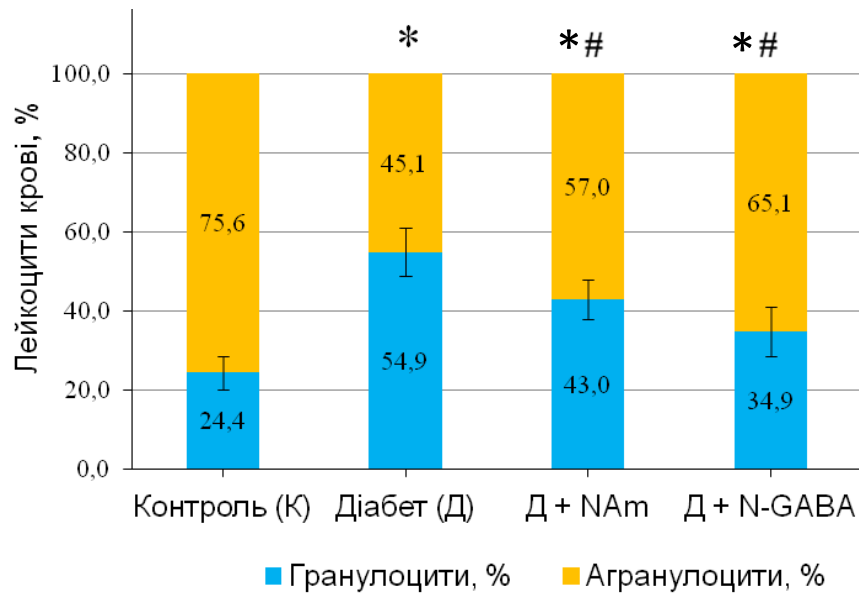


Рисунок 3.3. Перерозподіл лейкоцитів крові у групах піддослідних тварин ($n = 4-5$), $*P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”; $\# P < 0,05$ порівняно з групою “Діабет”

Гіперглікемія призводить до надмірного утворення АФК, відбувається інтенсифікація оксидативного стресу у лейкоцитах крові діабетичних щурів, результатом чого є підвищення в них базального рівня продукування АФК на 60% у порівнянні із контрольною групою тварин (рис. 3.4, 3.5). Оксидативний стрес спричиняється дисбалансом у функціонуванні про- та антиоксидантних систем. При цьому, введення NAm або N-GABA призводило до зниження рівня АФК в лейкоцитах на 27% та 32% порівняно з групою діабетичних тварин. Це свідчить про те, що ці сполуки можуть володіти антиоксидантною дією.

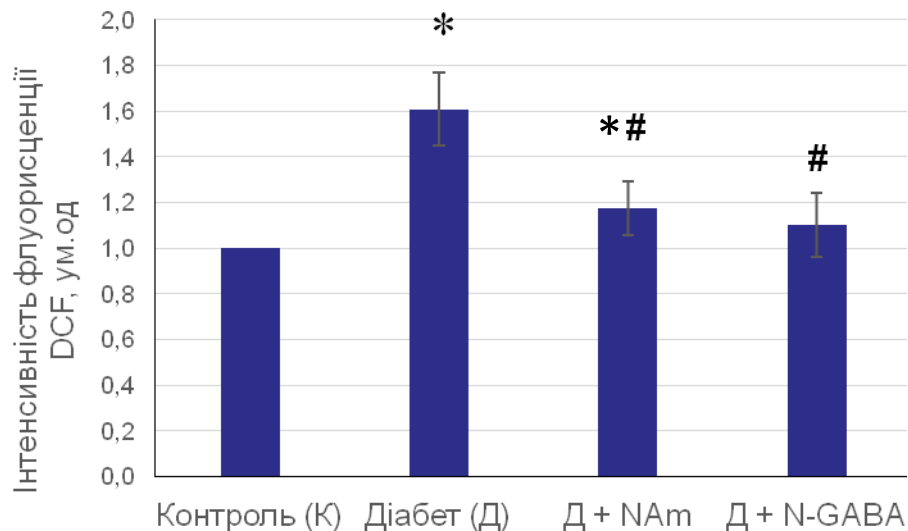


Рисунок 3.4. Відносна DCF флуоресценція у лейкоцитах крові діабетичних щурів ($n = 4-5$), $*P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”; $\# P < 0,05$ порівняно з групою “Діабет”

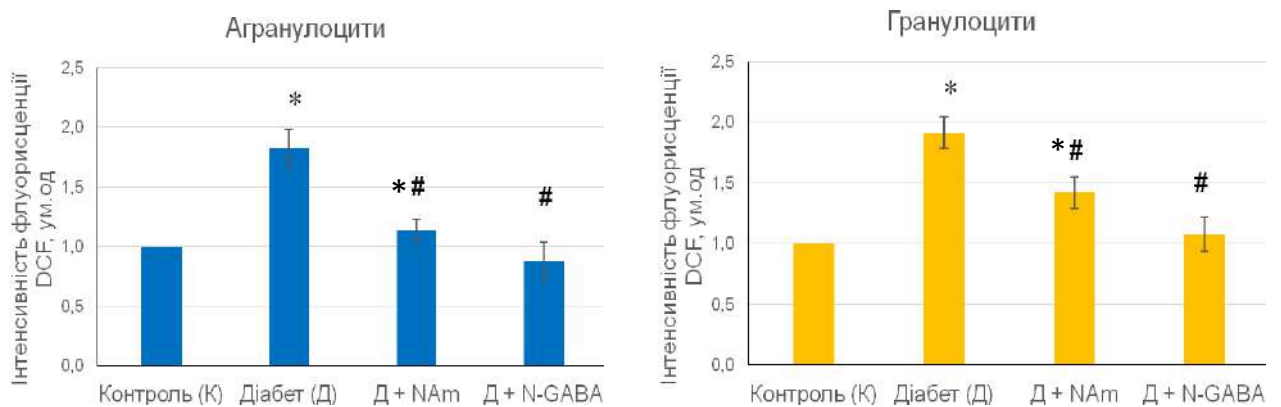


Рисунок 3.5. Рівень АФК у гранулоцитах та агранулоцитах крові щурів ($n = 4-5$). $* P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”; $\# P < 0,05$ порівняно з групою “Діабет”

Підвищення рівня АФК у мітохондріях лейкоцитів, які є головними внутрішньоклітинними джерелами їхнього продукування за діабету, супроводжується порушенням мітохондрійного гомеостазу і в кінцевому рахунку, дисфункціями клітин. Дійсно, було виявлено, що за ЦД відбувається зниження мітохондрійного мембранного потенціалу в 1,43 рази порівняно з групою контрольних щурів. Застосування NAm або N-GABA

сприяли підвищенню цього показника в 1,16 та 1,22 рази порівняно з групою діабетичних тварин, відповідно (Рис.3.6). [143, 144].

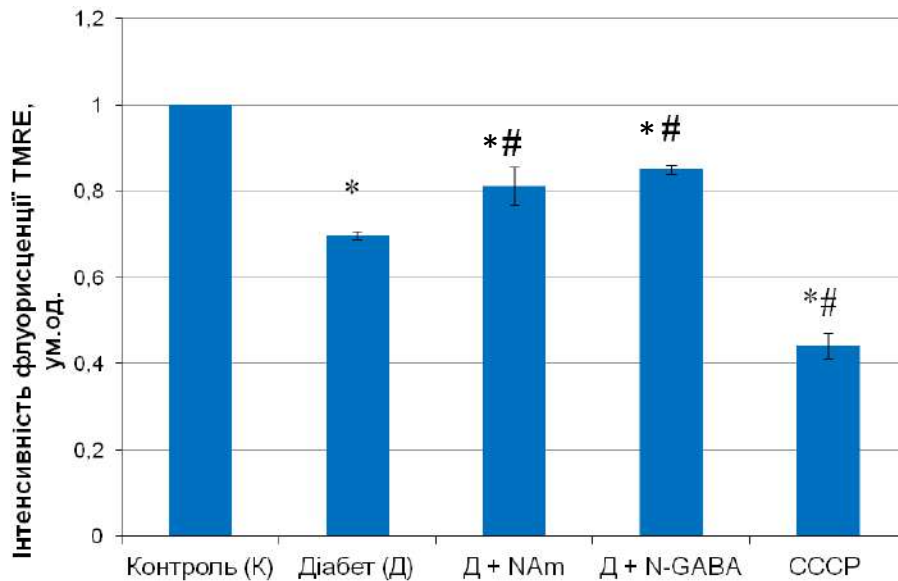
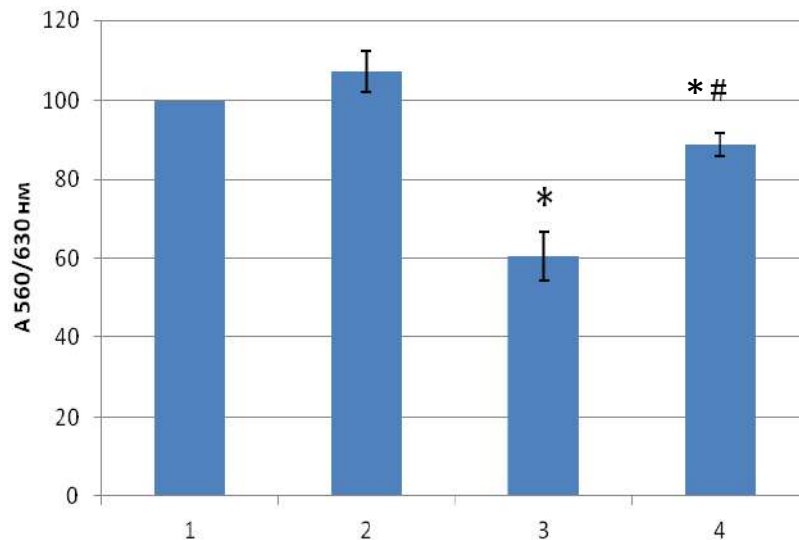


Рисунок 3.6. Рівень мітохондрійного мембранного потенціалу у лейкоцитах крові діабетичних щурів ($n = 4-5$), * $P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”; # $P < 0,05$ порівняно з групою “Діабет”

Збільшення кількості прозапальних чинників може призвести до послаблення або навіть загибелі β -клітини [145].

3.4. Ефект NAm на життєздатність клітин RIN-m5F

Як було зазначено гіперглікемія призводить до розвитку ОС, що запускає каскад різних патологічних процесів, що, в свою чергу, може призводити до загибелі клітин [146]. Доцільно було проаналізувати, чи володіє NAm антиоксидантними властивостями за дії високої концентрації глюкози, фактором, здатним викликати зниження життєздатності, порушення мембранного потенціалу мітохондрій і підвищення продукування АФК в панкреатичних клітинах RINm5F. За умов *in vitro* проведення МТТ-тесту дозволило встановити зниження життєздатності клітин за дії високої концентрації глюкози (100 ммоль/л) протягом 24 год на 39% (рис. 3.7).



*Рисунок 3.7. Життєздатність клітин RIN-m5F, час інкубації 24 год ($M \pm m$, $n=5$). Умовні позначення: 1 - контроль, 2 - NAM 1 ммоль/л, 3- глюкоза 100 ммоль/л; 4 - глюкоза 100 ммоль/л, NAM 1 ммоль/л; * $P < 0,05$ порівняно з контролем, # $P < 0,05$ порівняно з гіперглікемічними умовами*

Ці результати принаймні, частково, дозволяють припустити, що загибель RIN-m5F острівців β -клітин підшлункової залози може бути індукована апоптозом, як показали інші автори в умовах окисно-нітрозативного стресу [147]. Тому важливо оцінити, чи може NAM протидіяти оксидативному стресу, що є ключовим фактором ризику розвитку та прогресування різних хронічних нейродегенеративних захворювань, включаючи цукровий діабет [146]. Було показано, що NAM у концентрації 1 ммоль/л здатний запобігати загибелі досліджуваних клітин за дії цитотоксичного чинника, що свідчить про його цитопротекторну дію. Можна припустити, що здатність NAM запобігати загибелі клітин RIN-m5F може реалізовуватися на молекулярному рівні. Ці клітини для підтримки необхідних для їх життєздатності біологічних функцій потребують безперервного забезпечення АТР. За умов підвищеної продукції АФК рівень внутрішньоклітинного АТР знижується, але за дії NAM підвищується, не виключено, що шляхом запобігання виснаження пулу NAD^+ , що також узгоджується з даними інших авторів [148].

3.5. Рівень АФК клітинної лінії RINm5F за дії NAm

Нами встановлено, що за дії глюкози в концентрації 100 ммоль/л відбувалося підвищення рівня АФК у 1,41 рази. NAm (1ммоль/л) призводив до часткового пригнічення розвитку ОС (рис. 3.8). NAm викликав зниження у 1,20 рази глюкозо-індукованої продукції АФК, свідченням чого було значне зменшення флуоресценції DCF-барвника (рис.3.8.). Здатність досліджуваної сполуки пригнічувати розвиток оксидативного стресу, індукованого високою концентрацією глюкози, може здійснюватися за рахунок впливу на перебіг процесів, що протікають на поверхні зовнішньої мембрани, в цитозолі, та в ядрі клітин. NAm, як відомо є інгібітором процесу полі-ADP-рибозилування, запобігає деградації PARP-1 та сприяє репарації ДНК шляхом прямого інгібування каспази-3. Це свідчить про його антиапоптотичну дію на клітини підшлункової залози. Активація PARP-1 посилює клітинну утилізацію NAD^+ , що призводить до зниження рівня АТФ [149]. Тобто порушення NAD -залежних процесів супроводжується значним порушенням АТФ-залежних процесів, що може призводити до загибелі клітин, тому коригуючий вплив NAm може реалізуватися через посилення антиоксидантного захисту, інтенсифікацію біосинтезу піридинових нуклеотидів та нормалізацію, принаймі частково, енергетичного обміну [150-152].

Попередні наші дослідження показали, що NAm (5 ммоль/л) та N-метилнікотинамід, ендogenousний продукт метилювання вітаміну B_3 (1-70 ммоль/л), можуть проявляти цитопротекторну дію та гальмувати розвиток оксидативного стресу, індукованого СТЗ та високою концентрацією глюкози в острівцевих клітинах підшлункової залози. Однак на тлі дії СТЗ NAm в концентрації 35,0 ммоль/л призводив до інтенсифікації утворення АФК, що свідчить про його прооксидантні властивості за даної концентрації [12, 153].

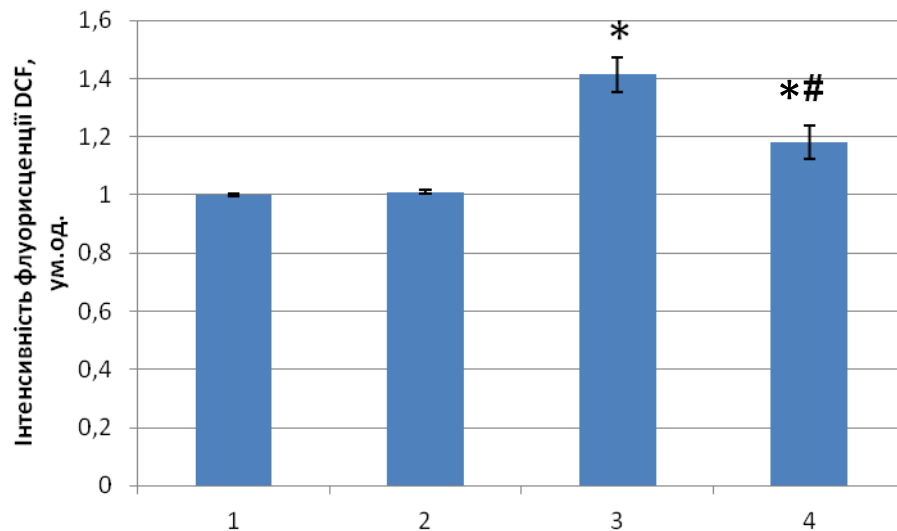


Рисунок 3.8. Рівень АФК у клітинах RIN-m5F, тривалість інкубації 24 год ($M \pm m$, $n=5$). Умовні позначення: 1 - контроль, 2 - NAM 1 ммоль/л, 3- глюкоза 100 ммоль/л; 4 - глюкоза 100 ммоль/л, NAM 1 ммоль/л; * $P < 0,05$ порівняно з контролем, # $P < 0,05$ порівняно з гіперглікемічними умовами

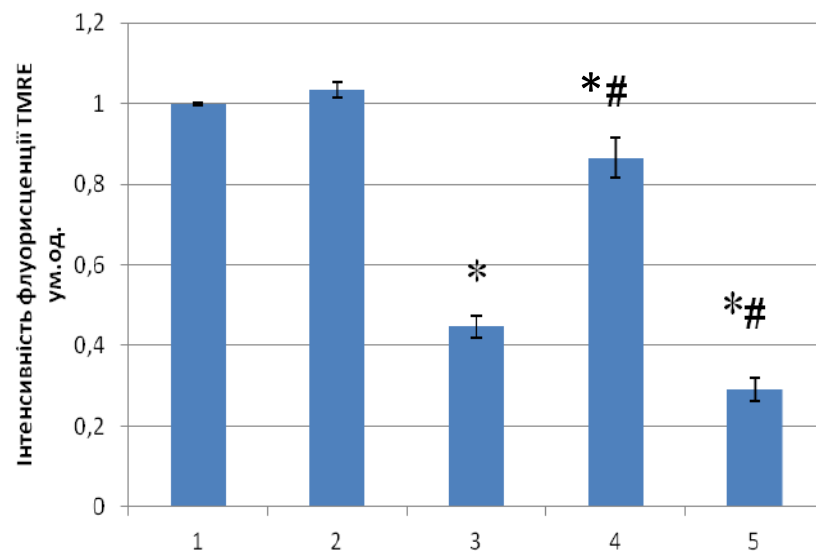
3.6. Мембранний потенціал мітохондрій клітин RINm5F: ефект NAM

На наступному етапі досліджень, важливо було оцінити дію даних чинників на мембранний потенціал мітохондрій на лінії клітин RINm5F. Відомо, що мітохондрії розглядаються як основне джерело АФК в клітині. З цієї причини за патологічних умов вони можуть продукувати АФК, рівень, яких є значно вищим, ніж за фізіологічних умов, що в кінцевому рахунку буде посилювати патологічні процеси в організмі і навіть його старіння. Хронічне збільшення продукції АФК відповідає за накопичення АФК-пов'язаних пошкоджень в ДНК, протеїнів і ліпідів, і може призводити до прогресуючих клітинних дисфункцій і, як наслідок, до апоптозу, підвищення загальної ймовірності патологічних станів організму. Супероксидний аніон головний небажаний побічний продукт мітохондрійного окисного фосфорилування [154].

Відомо, що оксидативний стрес в β -клітинах підшлункової залози знижує мітохондрійний мембранний потенціал, який може сприяти вивільненню апоптогенних факторів, що викликають загибель клітин [155]. Ось чому одним з можливих механізмів, що лежать в основі дисфункцій β -

клітин підшлункової залози, є підвищення продукції АФК у мітохондріях, які є переважним місцем утворення гідроксильних радикалів в панкреатичних β -клітинах.

Нами було продемонстровано, що за дії глюкози в концентрації 100 ммоль/л мембранний потенціал мітохондрій знижується у 2,24 рази порівняно з контролем. NAm приводив до підвищення мембранного потенціалу мітохондрій у 1,94 рази порівняно з групою клітин, які інкубувалися у середовищі з високою глюкозою (рис.3.4).



*Рисунок 3.9. Рівень мітохондрійного мембранного потенціалу у клітинах RIN-m5F, тривалість інкубації 24 год ($M \pm m$, $n=5$). Умовні позначення: 1 - контроль, 2 - NAm 1 ммоль/л, 3- глюкоза 100 ммоль/л; 4 - глюкоза 100 ммоль/л, NAm 1 ммоль/л; 5 – CCCP 100 мкмоль/л * $P < 0,05$ порівняно з контролем, # $P < 0,05$ порівняно з гіперглікемічними умовами*

Ці дані підтверджують, що саме функціональний стан мітохондрій відіграє важливу роль у життєздатності та функціонуванні клітин RINm5F, що узгоджуються із результатами інших дослідників [156].

Отримані результати свідчать про те, що на експериментальній моделі з клітинами RIN-m5F було виявлено, що між мембранним потенціалом мітохондрій та рівнем АФК існує взаємозв'язок.

Разом з тим коригувальний ефект NAm за дисфункцій клітин RIN-m5F, індукованих високою концентрацією глюкози, може реалізуватися не тільки

за рахунок його специфічної дії, як попередника синтезу NAD, але і завдяки їхнього впливу на пригнічення продукування АФК та частковій нормалізації функції мітохондрійної мембрани, що також може призводити до структурних та функціональних змін у цих клітин. Крім того, NAM також може сприяти збереженню цілісності геному, запобігати розвитку запальних процесів в β -клітинах підшлункової залози і опосередковано підтримувати гомеостаз глюкози в крові [157].

3.7. Вплив NAM на ендотелійні клітини EA.hy926 за високої концентрації глюкози

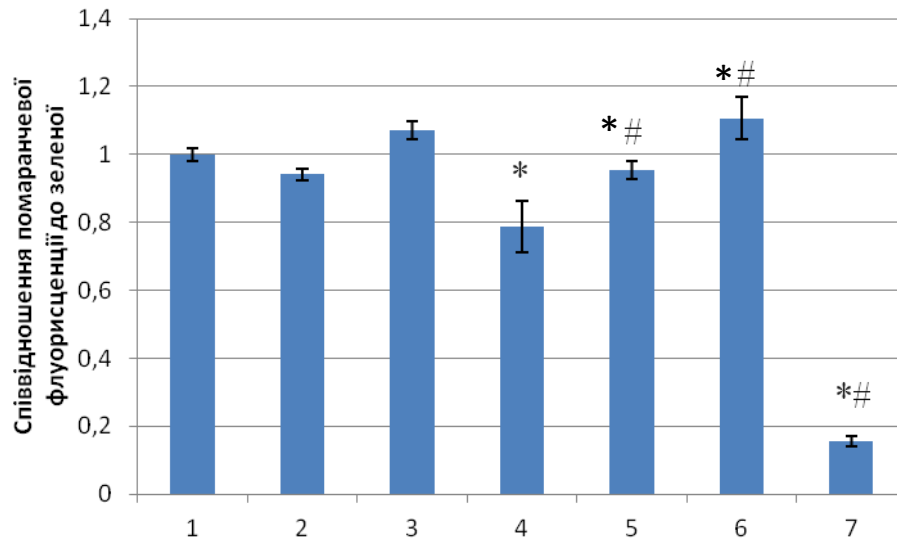
Підвищений вміст глюкози в крові призводить до розвитку дисфункцій ендотелію. Ендотелійна дисфункція, в свою чергу, супроводжується розвитком діабетичних макросудинних і мікросудинних ускладнень [158]. Порухення функцій ендотелію може бути результатом дії високої концентрації глюкози, яка індукує оксидативний стрес, переважно за участі мітохондрій, зміни мембранного потенціалу, а також відкриття мітохондрійної пори та вивільнення мітохондрійних протеїнів з внутрішньомембранного простору, може підвищувати рівень експресії запальних факторів і молекул клітинної адгезії. Дійсно, показано, що за діабету експресія ендотелійної p53 помітно підвищується, а ендотелій-залежна вазодилатація значно порушується [159].

З літературних джерел відомо, що декілька джерел продукування АФК можуть бути залучені до змін різного генезу у ендотелійних клітинах як за гіперглікемії, так і за участі NADPH-оксидази, одних із основних продуцентів АФК у серцево-судинній системі [160]. Однак, електронно-транспортний ланцюг у мітохондріях також розглядається як джерело активних форм кисню. Слід зазначити, що утворення АФК за участі NOX та дихального ланцюгу може бути фізіологічним регулятором внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, особливо, за їх надмірного продукування, що призводить до секреції цитокінів, проліферації судин,

гіпертрофії та ремоделювання. Надпродукування АФК може індукувати прогресування атеросклерозу, за якого ступінь пошкодження мітохондрій ендотелію є високим [161]. До дисфункції ендотелію та в, кінцевому рахунку, загибелі клітин призводить інтенсифікація пероксидного окислення ліпідів, розриви ниток ДНК, окислення протеїнів тощо [162].

Проведені нами дослідження на ендотелійних клітинах EA.hy926, за нормальних (концентрація глюкози в середовищі - 5 ммоль/л) та гіперглікемічних (концентрація глюкози в середовищі - 30 ммоль/л) умов продемонстрували, що за умов гіперглікемії відбувається зниження мембранного мітохондрійного потенціалу в ендотелійних клітинах EA.hy926 у 1,37 рази порівняно з контролем, що є фактором ризику загибелі цих клітин. Інкубування клітин з нікотинамідом в концентрації 0,1 ммоль/л за гіперглікемічних умов не супроводжувалося значними змінами мітохондрійного мембранного потенціалу, однак NAm в концентрації 1 ммоль/л підвищував у 1,21 рази порівняно з гіперглікемічними умовами, що сприяло виживанню клітин (рис.3.10).

Виявлена нами протекторна дія NAm (1 ммоль/л) може бути результатом участі SIRT1, оскільки існують дані, що ця NAD-залежна деацетилаза запобігає як оксидативному, так і індукованому гіперглікемією пошкодженню ендотелійних клітин, за судинних ускладнень діабету 1 та 2 типу [163]. Більше того, ці дані узгоджуються з отриманими нами результатами щодо корегуючої дії SIRT за дисфункції мозку за експериментального ЦД 1 типу [164].



*Рисунок 3.10. Рівень мітохондрійного мембранного потенціалу ендотелійних клітин EA.hy926 згідно співвідношення помаранчевої до зеленої флуорисценції за дії різних чинників: 1 – контроль, глюкоза в концентрації 5 ммоль/л, 2 - 0,1 ммоль/л нікотинамід, 3 - 1 ммоль/л нікотинамід, 4 - глюкоза в концентрації 30 ммоль/л, 5- 30 ммоль/л глюкоза, 0,1 ммоль/л нікотинамід, 6 - 30 ммоль/л глюкоза, 1 ммоль/л нікотинамід, 7- СССР, 5 мкмоль/л, валіноміцин (25 мкг/мл), $M \pm t$, $n=5$. * - $P < 0,05$ відносно контролю, #- $P < 0,05$ відносно гіперглікемічних умов*

За виявлених змін у клітинах EA.hy926 доцільно було провести оцінку їх морфологічного стану за нормальних та гіперглікемічних умов, а також за дії NAM в концентрації 0,1 та 1 ммоль/л. За нормальних умов спостерігали, що NAM в концентрації 0,1 ммоль/л сприяв поділу цих клітин, хоча для них це не властиво при повній конфлюентності. Мітохондрії ендотелійних клітин за нормальних умов були інтенсивно зафарбованні барвником Mitotracker CMX Ros, тоді як клітини, які інкубували у середовищі з високою концентрацією глюкози мали розсіяне фарбування (рис.3.11). Слід зазначити, що у клітинах без внесення різних чинників розподіл мітохондрій був по всій клітині. Крім того, ці мітохондрії були організовані як розширені трубчасті структури. У клітинах EA.hy92 за умов гіперглікемії спостерігали зміни у розподілі мітохондрій у клітині. Як показано нами, у деполаризованих мітохондріях, а також за оксидативного стресу виявляють також фрагментацію трубчастої структури [165].

При інкубуванні клітин з NAm в концентрації 1 ммоль/л спостерігали також розсіяне забарвлення Mitotracker CMX Ros та заокруглену форму. При інкубуванні клітин за умов гіперглікемії було виявлено утворення вакуолей, що може бути початком процесу аутофагії, яка є селективною для мітохондрій, які зазнають змін при низькому рівні мітохондрійного мембранного потенціалу та високому рівні АФК. При дії 0,1 ммоль/л NAm за високої концентрації глюкози проліферативна активність знижувалася. NAm підвищує рівень NAD^+ , то він також може впливати на відновлення редокс-стану. Співвідношення $NAD^+/NADH$ є регулятором багатьох метаболічних процесів в тому числі і енергетичного обміну функцій мітохондрій. NAD-залежні SIRT1 та інші протеїни родини сіртуїнів відіграють важливу роль у життєздатності клітин та тривалості життя шляхом регулювального впливу на метаболізм та функції мітохондрій зокрема [166]. За умов високої деполаризації мітохондрій, ці структурні компоненти клітини можуть руйнуватися, а продукти їх розпаду знешкоджуються шляхом аутофагії (мітофагія) [167].

Враховуючи той факт, що SIRT1 відіграє важливу роль в аутофагії [168], він також може відігравати певну роль у прямому знешкодженні надмірної кількості АФК через FOXO3a-опосередковану регуляцію експресії антиоксидантного гена [169]. Мітохондрійна аутофагія може бути опосередкована активацією SIRT1, внаслідок збільшення співвідношенням $NAD^+/NADH$, що спричинено дією NAm. [166]. Корируюча дія NAm може реалізуватися шляхом зниження окисного фосфорилування, ймовірно, через зменшення потоку електронів до комплексу I електронно-транспортного ланцюга, що, в свою чергу, також призводить до зниження продукування супероксиду [170, 171].

Таким чином, механізми позитивної дії NAm або N-GABA можуть реалізуватися шляхом пригнічення розвитку запальних процесів, часткового відновлення структурних та метаболічних функцій клітин підшлункової залози та ендотелійних клітин.

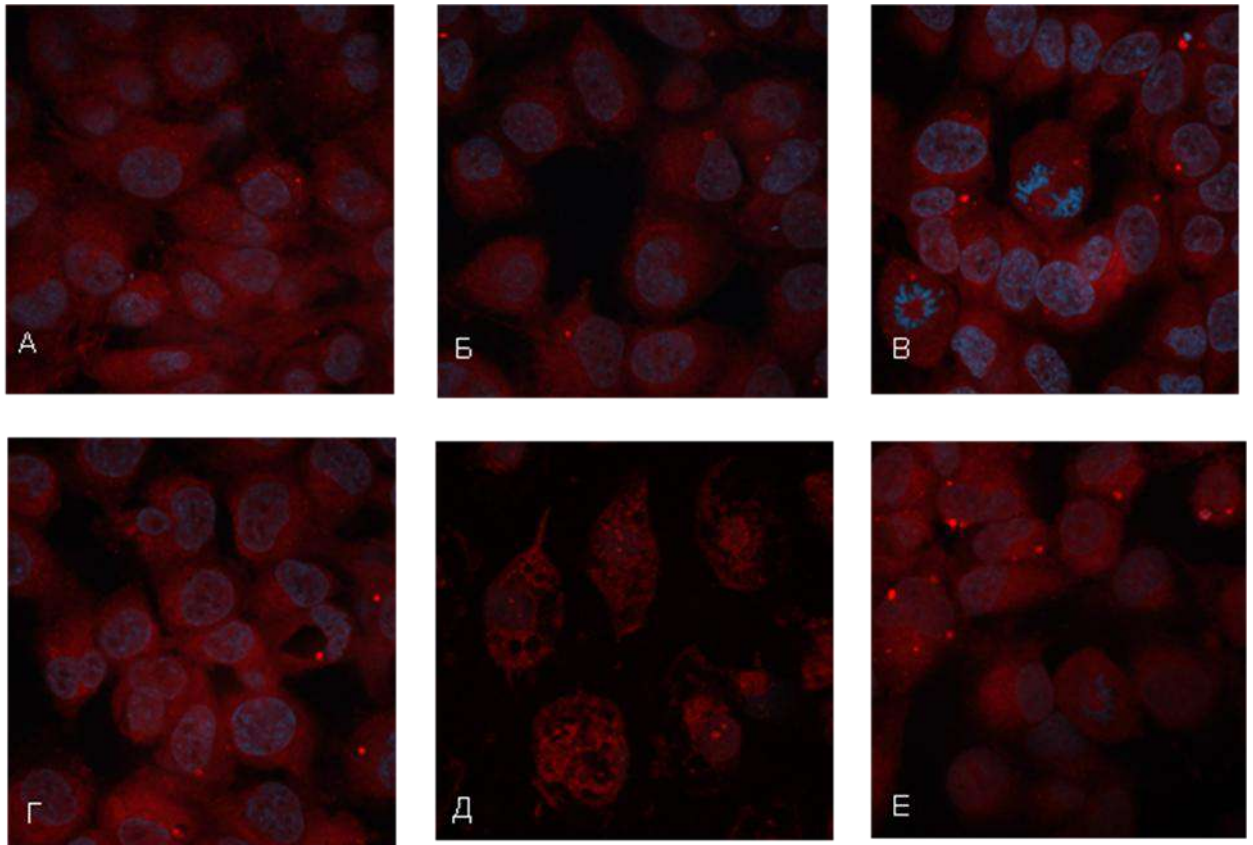


Рисунок 3.11. Морфологічні зміни у ендотелійних клітинах EA.hy926 за дії досліджуваних чинників. Примітки: червоний колір - мітохондрії пофарбовані Mitotracker CMX Ros; синій колір - ядро пофарбоване DAPI. Всі зображення приймаються одній конфокальній площині. А- контроль, глюкоза 5 ммоль/л, Б - глюкоза, 5 ммоль/л, NAt 1 ммоль/л, В - глюкоза 5ммоль/л, NAt 0,1 ммоль/л, Г - глюкоза 30 ммоль/л, Д – глюкоза 30 ммоль/л, NAt 1 ммоль/л, Е - глюкоза 30 ммоль/л, NAt 0,1 ммоль/л

Основні наукові результати розділу опубліковані в роботах:

1. Кучмеровська ТМ, Донченко ГВ, **Тихоненко ТМ**, Гузик ММ, Яніцька ЛВ, Степаненко СП, Клименко АП. Вплив нікотинаміду на функціональний стан острівцевих клітин підшлункової залози. Укр. біохім. журн. 2012; 84(2): 81-88.
2. Guzyk MM, **Tykhonenko TM**, Donchenko GV, Kuchmerovska TM. PARP-1 inhibition under oxidative stress in pancreatic islet cells. Materials of Joint meeting of the islet study group & beta cell workshop. (Jerusalem, May 3-7, 2015). Israel, 2015. P. 147.

3. Гузик ММ, Дякун КО, **Тихоненко ТМ**, Яніцька ЛВ, Кучмеровська ТМ. Вплив інгібіторів полі ADP-рибополімерази-1 (PARP-1) на клітини підшлункової залози лінії RINm5f. Матеріали IV Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю “Хімія природних сполук”. (Тернопіль, 21-22 квітня, 2016). Україна, 2016. С. 75-76.
4. **Тихоненко ТМ**, Донченко ГВ, Клименко АП, Ставнійчук РВ, Кучмеровська ТМ. Цитотоксична дія стрептозотоцину на бета-клітини підшлункової залози щурів: ефект N-метилнікотинаміду. Матеріали науково-практичної конференції “Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології” (Десяті Данилевські читання). (Харків, 3-4 березня, 2011). Україна, 2011. С. 128-129.
5. Guzyk MM, **Tykhonenko TM**, Dyakun KO, Yanitska LV, Pryvrotska IB, Kuchmerovska TM. Altered sirtuins 1 and 2 expression in the brain of rats induced by experimental diabetes and the ways of its correction. Ukr.Biochem.J. 2019; 91(1): 21-29.
6. **Тихоненко ТМ**, Гузик ММ, Дякун КО, Кучмеровська ТМ. 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. (Харків, 28 лютого – 1 березня, 2019). Україна, 2019. С. 123-124.

РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ ПЕРЕБІГУ ОСНОВНИХ ПАТОГЕНЕТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ ЗА ДІАБЕТИЧНИХ УСКЛАДНЕНЬ

4.1. Структурні та метаболічні зміни у сідничному нерві індуковані ЦД 1 типу

Серед пізніх ускладнень ЦД, особливе місце належить периферійній діабетичній нейропатії (ПДН), яка розвивається майже в 50% хворих на ЦД. Відомо, що серед багатьох патогенетичних процесів, які виникають за діабетичних нейропатій значне місце належить активації поліолового шляху обміну глюкози в багатьох тканинах, що може підвищувати рівень глюкози в крові. Тому доцільно було визначити рівень сорбітолу у сідничному нерві. Отримані дані свідчать про те, що за ЦД відбувається збільшення вмісту сорбітолу в сідничному нерві в 10,44 рази у порівнянні з контролем що узгоджується з даними інших досліджень [172]. Хронічне введення NAm або N-GABA діабетичним щурам призводило до зниження вмісту сорбітолу у 3,63 та 1,53 рази відповідно, порівняно з діабетичною групою. NAm, як попередник біосинтезу NAD здатен коригувати поліоловий шлях обміну глюкози більш ефективно, в порівнянні з N-GABA. Це може вказувати на те, що поліоловий шлях обміну глюкози не є основною ланкою реалізації нейротропної дії N-GABA (табл. 4.1).

*Таблиця 4.1. Вміст сорбітолу в сідничному нерві, мкмоль/г тканини,
M ± m, n=3-4*

Група	Контроль	Діабет (Д)	Д + NAm	Д+ N-GABA
Сідничний нерв	0,136±0,011	1,420±0,190*	0,391±0,029*#	0,9270±0,079*#

*Примітка: *P<0,05 порівняно з групою “Контроль”; # P<0,05 порівняно з групою “Діабет”*

Згідно даних таблиці 4.1 стає очевидним, що активність ключових ензимів поліолового шляху обміну глюкози за діабету в сідничному нерві

значно змінюється, що відіграє важливу роль у формуванні комплексу патологічних змін, характерних для діабетичної периферійної нейропатії: активність альдозоредуктази підвищена на 80 %, в той час як активність сорбітолдегідрогенази, навпаки, знижена на 54,3%, у порівнянні з контролем. За введення NAm або N-GABA спостерігали зворотну картину: активність альдозоредуктази знижувалась на 29,3 і 24,3 % відповідно, а активність сорбітолдегідрогенази не змінювалася у порівнянні з показниками діабетичних тварин. Тобто, досліджувані сполуки проявляли коригувальну дію на активність альдозоредуктази, що, в свою чергу, частково нормалізувало функціонування поліолового шляху обміну глюкози (табл. 4.2).

Таблиця 4.2. Активності ензимів поліолового шляху обміну глюкози сідничного нерва щурів, нмоль субстрату на 1 мг протеїну за 1 хв, $M \pm m$, n=3-4

Група	Контроль	Діабет (Д)	Д + NAm	Д + N-GABA
Альдозо-редуктаза	40,28±4,43	72,56±4,87*	51,28±4,02*#	54,93±4,92*#
Сорбітол-дегідрогеназа	12,53±1,84	5,72±0,74*	6,97±0,70	6,32±0,89

*Примітка: *P<0,05 порівняно з групою “Контроль”; # P<0,05 порівняно з групою “Діабет”*

Як було зазначено раніше, функціонування поліолового шляху тісно пов'язано з гліколізом та пентозофосфатним циклом. Так, перетворення глюкози в сорбітол відбувається за участю NADPH, наслідком чого є конкуренція з іншими NADPH-залежними процесами. Головним джерелом NADPH у більшості тканин є пентозофосфатний шлях, інтенсивність якого може залежати від співвідношення NADP/NADPH. Перетворення сорбітолу у фруктозу відбувається за участю NAD, який також використовується у гліколізі. Збільшення активності поліолового шляху викликає збільшення

утворення NADH, що в свою чергу може призводити до змін співвідношення вільних NAD(P)/NAD(P)H пар цитозолу.

Накопичення сорбітолу в клітинах призводить до порушення осмотичних явищ та змін поглинання міоїнозитулу, що, в свою чергу, супроводжується зменшенням в тканинах фосфоїнозитидів, що викликає зменшення гідролізу фосфатиділінозитол-дифосфату та уповільнення утворення диацилгліцеролу, який є регуляторним активатором протеїнкінази C, що в свою чергу активує Na^+, K^+ -АТФазу. Оскільки сорбітол дуже повільно обмінюється в усіх тканинах, за винятком печінки, це призводить до його тканинної акумуляції при тривалій гіперглікемії, що в свою чергу може призвести до загибелі клітин [173]. Також значну роль у розвитку діабетичної полінейропатії відіграє посилене утворення фруктози.

Метаболічні зміни в сідничному нерві можуть супроводжуватися структурними змінами. Тому важливо було провести гістологічний аналіз сідничного нерва досліджуваних груп тварин. Отримані дані показали, що у контрольній групі тварин структурна організація нерва чітко диференціюється, спостерігаються сполучнотканинні елементи епіневрїю і периневрїю, ендоневрїю – слабо диференційовані. За ЦД 1 типу ми спостерігали деформацію контуру поверхневих волокон, втрату мієлінових оболонок і навіть часткову фрагментацію волокон, на різних відрізках реєстрували вогнищевий набряк волокон, як правило поблизу перехватів Ранв'є, і зменшення товщини нервових волокон, гіперімпрегнацію, що також підтверджується результатами інших дослідників (рис. 4.1) [174].

Ці зміни в нервах діабетичних щурів супроводжувалися змінами щільності волокон. При цьому суттєвої різниці між правим і лівим сідничним нервами не встановлено. Введення NAm або N-GABA призводило до часткового відновлення структурних змін сідничного нерву і до незначного збільшення щільності волокон (табл. 4.3) [175].

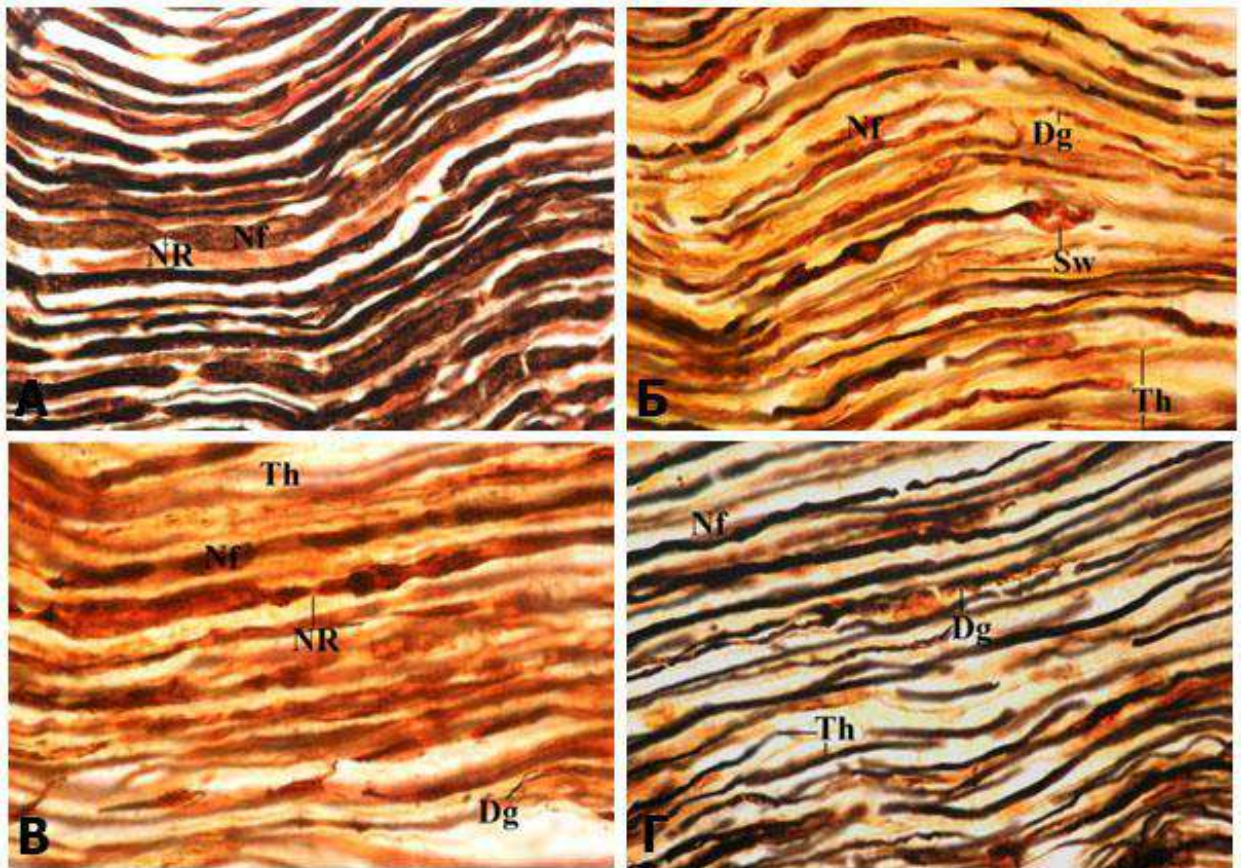


Рисунок 4.1. Гістологічна будова сідничого нерва щурів контрольної та дослідних груп. А – контроль, Б – діабет (Д), В - Д+NAм, Г - Д+N-GABA. Примітка: Nf-нервові волокна у сідничному нерві щура; Sw- мієліновий фокальний набряк, NR- вузол Ранв'є, Th- товщина нервових волокон, Dg- дегенерація нервових волокон. Обробка сріблом, × 1000

Існують дані, що NAM запобігає Валеровій дегенерації (Wallerian degeneration), процесу руйнування ділянки аксону віддаленої від основної частини нейрону при розриві [176]. Щодо даних, які б демонстрували роль N-GABA у процесах за діабетичної периферичної нейропатії немає.

Виявлені нами зміни можна розглядати як доказ того, що розвивається периферична діабетична нейропатія. Ці структурні зміни можуть слугувати для пояснення втрати чутливості, судинних розладів кінцівок і порушення іннервації скелетних м'язів.

Таблиця 4.3. Морфометрична оцінка щільності в сідничному лівому і правому нервах щурів

Група	Щільність нервових волокон у сідничному нерві, од/мм ²	
Контроль – лівий нерв	7058,8 [6274,5-8235,2]	7058,8 [6666,6-8235,2]
Контроль – правий нерв	7450,9 [6862,7-8235,2]	
Діабет – лівий нерв	5882,3 [4313,7-7058,8] *	5490,1 [4705,8-6274,5] *
Діабет – правий нерв	5490,1 [5098,0-6274,5] *	
Діабет + NAm – лівий нерв	7450,9 [6666,6-9119,6] *#	6862,7 [5882,3-8137,2] *#
Діабет + NAm – правий нерв	6274,5 [5882,3-7058,8] *#	
Діабет + N-GABA – лівий нерв	6274,5 [5882,3-7450,9] *#	6666,6 [5882,3-7450,9] *#
Діабет + N-GABA – правий нерв	6862,7 [6274,5-7843,1] *#	

Примітка: * $P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”; # $P < 0,05$ порівняно з групою “Діабет”

На тлі змін у нервовій тканині, нами було встановлено, що відбуваються зміни і в кістковій тканині, основним компонентом якої є колаген I типу гомілкових кісток. Не виключено, що зміни в амінокислотному складі колагену можуть призводити до розвитку остеопорозу. Хоча вважають, що зміни в амінокислотному складі колагену внаслідок модифікацій можуть значно впливати на його властивості, на даний час існує мало доказів стосовно амінокислотного складу саме колагену I типу в залежності від біодоступності вітамінів, які необхідні для його синтезу. Нами було виявлено, що за діабету у виділеному колагені I типу відбуваються зміни амінокислотного складу, головним чином, тих амінокислот, які, як відомо, залучені до формування спіралі та зшивок між

молекулами. Так, спостерігали значне зниження вмісту залишків o-Pro, Gly, Ala, o-Lys та Pro та збільшення Lys, His, Arg, Glu, Thr, Leu, Phe ($p < 0,05$). Введення діабетичним щурам нікотинаміду супроводжувалося частковою нормалізацією амінокислотного складу колагену I типу. Можна припустити, що нікотинамід, як попередник біосинтезу піридинових нуклеотидів, здатен позитивно впливати на структурний і функціональний стан колагену I типу шляхом нормалізації біосинтетичних процесів через активацію NADPH-залежних процесів відновлення вітамінів C та E, які, як відомо, виступають кофакторами посттрансляційної модифікації молекул колагену [177].

4.2. Дія NAm та N-GABA на перебіг патогенетичних процесів у мозку за ЦД 1 типу

З літературних даних відомо, що діабетична нейропатія та енцефалопатія характеризується структурними, метаболічними, нейрохімічними та дегенеративними нейрональними змінами, дефіцитом швидкості нервової провідності та зміненою механічною і термічною чутливістю, дегенерацією дистальних нервових волокон, зниженою здатністю до регенерації пошкоджених аксонів [178], що, в свою чергу, призводить до когнітивних порушень. Серед численних факторів, що можуть призводити до розвитку нейропатії, є судинні порушення, інтенсифікація оксидативного та нітрозативного стресу, імуннозалежне пошкодження нейронів або клітин глії [179]. Для того щоб з'ясувати чи розвивається діабетична енцефалопатія було проведено ряд досліджень.

Нами було показано, що за ЦД 1 типу відбувалася активація поліолового шляху обміну глюкози не тільки в сідничних нервах, але і в мозку (табл.4.4).

Як видно із отриманих даних за ЦД 1 типу відбувається накопичення сорбітолу у мозку тварин та варіює в залежності від його відділу. Одержані дані свідчать про те, що у гіпоталамусі вміст сорбітолу підвищений на 55,6%, в корі великих півкуль – на 66,7%, в гіпокампі – на 125,0%, в

мозочку – на 93,9%, в стовбурі – на 54,8% і в продовгуватому мозку – на 79,5% в порівнянні з відповідними показниками у контрольних тварин. Результатом накопичення сорбітолу в окремих відділах мозку діабетичних тварин є збільшення його вмісту в цільному мозку в 1,7 рази в порівнянні з контрольними тваринами. Введення NAm діабетичним щурам призводило до зниження вмісту сорбітолу у цільному мозку на 39%, а також у всіх досліджуваних його відділах, причому найбільш виражено у гіпокампі та мозочку.

Таблиця 4.4. Вміст сорбітолу у мозку щурів та його окремих відділах, мкмоль/г тканини ($M \pm m$, $n = 5-6$).

Група Об'єкт дослідження	Контроль	Діабет	Діабет + NAm
Гіпоталамус	0,187±0,015	0,291±0,032*	0,201±0,029#
Кора великих півкуль	0,024±0,003	0,040±0,004*	0,029±0,008#
Мозочок	0,033±0,004	0,064±0,009*	0,027±0,009#
Гіпокамп	0,036±0,005	0,081±0,007*	0,038±0,008#
Стовбур	0,031 ±0,003	0,048±0,006*	0,026±0,007#
Подовгуватий мозок	0,044±0,008	0,079±0,010*	0,045±0,006#
Мозок	0,357±0,041	0,607±0,074*	0,369±0,042#

Примітка: * $P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”; # $P < 0,05$ порівняно з групою “Діабет”

Тобто, активація альдозоредуктази за умов підвищення співвідношення NADPH/NADP-пар за діабету супроводжується накопиченням сорбітолу в мозку. Оскільки для мембран нервових клітин характерним є дуже низька зворотна проникність сорбітолу, то встановлене нами його накопичення як в мозку може призводити до набряку нервової тканини, а також бути одним із пускових механізмів розвитку діабетичної енцефалопатії. Більше того,

підвищена утилізація NADPH у результаті активації поліолового шляху обміну глюкози, що супроводжується порушенням осмотичних процесів у клітинах, посилює синтез простагландинів, що, в свою чергу, приводить до зменшення рівня відновленого глутатіону, а також активує пентозофосфатний шлях, що забезпечує тріозо-фосфатні інтермедіати для синтезу *de novo* [180].

Дійсно, із даних представлених у таблиці 4.5 стає очевидним, що активність ензимів поліолового шляху обміну глюкози за діабету у мозку зазнає змін: активність альдозоредуктази підвищилася на 74 %, у той час як незначне підвищення активності сорбітолдегідрогенази було не достовірним у порівнянні з контролем.

Таблиця 4.5. Активності ензимів поліолового шляху обміну глюкози у мозку щурів, нмоль субстрату на 1 мг протеїну за 1 хв ($M \pm m$, $n=5-6$)

Група	Контроль	Діабет (Д)	Д +NAм
Альдозоредуктаза	14,3±1,6	24,9±2,5*	17,6±1,9#
Сорбітолдегідрогеназа	4,8±0,5	5,7±0,6	6,8±0,7

Примітка: * $P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”; # $P < 0,05$ порівняно з групою “Діабет”

У той час, як при введенні NAм активність альдозоредуктази знижувалась на 29%, активність сорбітолдегідрогенази за його дії практично не змінювалася у порівнянні з показниками діабетичних тварин. Тобто, виявлений коригуючий вплив хронічного введення NAм на активність ключового ензиму поліолового шляху обміну глюкози, в кінцевому рахунку, супроводжувався частковою нормалізацією його функціонування. За ЦД 1 типу при активації поліолового шляху обміну глюкози у мозку щурів та підвищеної концентрації глюкози в крові може відбуватися посилене утворення фруктози. Дійсно, нами було виявлено, що у діабетичних щурів на тлі підвищення рівня глюкози у крові у 4,2 рази

відбувається посилене утворення фруктози, а саме: $3,6 \pm 0,4^*$ проти $0,5 \pm 0,1$ мкмоль на 1 г сирової маси тканини мозку, на рівень якої нікотинамід не впливав. Збільшення вмісту фруктози за цукрового діабету, в свою чергу, призводитиме до розвитку патологічних процесів, зокрема модифікації протеїнів або ж до їх посилення [181]. Перетворення сорбітолу у фруктозу відбувається за участю NAD, що конкурує з гліколізом у гліцеральдегіддегідрогеназній реакції. Крім того, підвищення співвідношення NADH/NAD за діабету, що продемонстровано нами для сідничного нерву призводить до збільшення перетворення діоксиацетонфосфату в гліцерол-3-фосфат, пірувату в лактат та зменшення утворення 3-фосфогліцерату з гліцеральдегід-3-фосфату. Тобто, не виключено, що підвищення вмісту фруктози у мозку діабетичних щурів пов'язано не лише із активацією поліолового шляху обміну глюкози, але із зниженням її фосфорилування та надходження у гліколіз у формі фруктозо-6-фосфату, в результаті нестачі АТФ за діабету, що показано нами раніше [182].

Також варто зазначити, що функціонування поліолового шляху обміну глюкози тісно пов'язано не тільки з гліколізом, але й з пентозофосфатним шляхом, продуктом якого є NADPH у більшості тканин, від рівня якого залежить співвідношення NADP/NADPH. Тому, перетворення глюкози в сорбітол, що відбувається за участю NADPH призводить до конкуренції з іншими NADPH-залежними процесами.

Разом із тим, порушення функціонування ЦНС за ЦД 1 типу неможливо пояснити лише активацією поліолового шляху обміну глюкози, оскільки за гіперглікемії також знижується пул міоїнозитулу [183]. Виснаження пулу міоїнозитулу за цукрового діабету також відбувається в результаті того, що надмірна кількість глюкози конкурує з ним за поглинання тканинами. Більше того, міоїнозитол є попередником синтезу фосфоїнозитидів, таких як фосфатидилінозитол, який, в свою чергу,

активує Na^+ , K^+ -АТРаду прямо або через утворення вторинних месенжерів, таких як інозитол поліфосфати і диацилгліцерол [184-186]. Виявлене нами накопичення сорбітолу в мозку може призводити до порушення осморегуляції нервових клітин та потовщення їх базальної мембрани. Так, у периферійних нервах за аналогічних умов відбувається зв'язане з накопиченням сорбітолу набухання по типу внутрішньопучкового, що, очевидно, призводить до уповільнення проведення нервового імпульсу [187].

У результаті порушення іонного гомеостазу обумовленого надлишком сорбітолу у мозку діабетичних тварин буде відбуватися гідратація клітин з акумуляцією в них Na^+ та одночасною втратою K^+ . Це, в свою чергу, призводитиме до змін внутрішньоклітинного співвідношення цих катіонів на тлі зниження АТФ [183], який є субстратом для мембранних АТРади, та до пригнічення активності Na^+ , K^+ -АТРади [188].

Отже, проведені дослідження дають підставу стверджувати, що у мозку за цукрового діабету існує функціональний зв'язок між поліоловим шляхом обміну глюкози та NAD(P)-залежними процесами [189].

Разом з даними, що стосуються оксидативного стресу та запалення за патології діабету, дослідження, проведені на різних експериментальних моделях клітин і тварин, також дозволяють припустити, що активація NF- κ B є ключовою подією на початку розвитку цього захворювання та його ускладнень. Дослідження в різних експериментальних моделях показали, що дисфункція нейронів тісно пов'язана з активацією NF- κ B та експресією прозапальних цитокінів [190], а також, що нейрональний апоптоз, який супроводжується активацією NF- κ B, може відігравати важливу роль у втраті нейронів і порушення когнітивної функції [191]. Тому доцільно було оцінити вміст транскрипційного фактору NF- κ B. За даними Вестерн-блот-аналізу вміст NF- κ B збільшувалася в 3,5 рази у мозку діабетичних щурів порівняно з контролем, $P < 0,05$. Існують дані що в гіпокампі діабетичних щурів

спостерігається не тільки надпродукція АФК, але також і стійка активація NF-κB [192]. Хронічне введення NAm діабетичним щурам викликало незначне зниження вмісту протеїну NF-κB (в 1,31 рази), тоді як помітне зниження вмісту протеїну NF-κB було виявлено при застосуванні N-GABA (у 1,73 рази) (рис.4.2) [193].

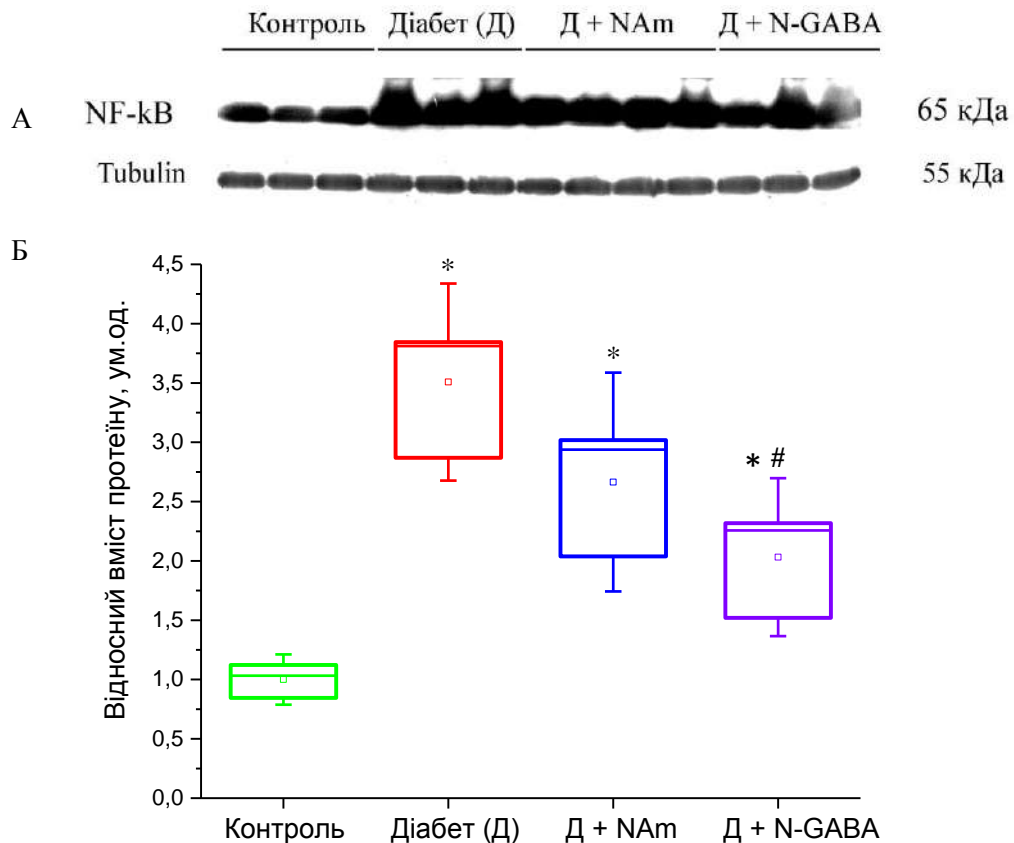


Рисунок 4.2. Вестерн-блот аналіз протеїну транскрипційного фактору NF-κB у тканині мозку щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б), $M \pm t$ ($n = 3-4$). * $P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”; # $P < 0,05$ порівняно з групою “Діабет”

Існують дані, що відбувається інгібування NF-κB шляху нікотинамідом за хвороби Альцгеймера [194]. Дія N-GABA на вміст NF-κB за ЦД 1 типу нами була показана вперше.

Крім того, оксидативний стрес, індукований гіперглікемією, викликає ВАХ-асоційовані події, включаючи наступну активацію каспази і прогресування апоптотичної загибелі клітин. Дійсно, наші результати показали, що вміст проапоптотичного протеїну ВАХ в діабетичній групі

збільшився в 2,02 рази, порівняно з контрольною групою (рис. 4.3). Така надекспресія протеїну BAX може призвести до мітохондрійної дисфункції і навіть до загибелі клітин. Інші дослідження також показали, що через вісім тижнів вміст проапоптотичного протеїну BAX був підвищений в гіпокампі СТЗ-індукованої діабетичної групи порівняно з контрольною групою щурів. З іншого боку, вміст антиапоптотичних протеїнів Bcl-2 і Bcl-xL зменшувався в гіпокампі СТЗ-індукованої діабетичної групи, порівняно з контрольною групою щурів.

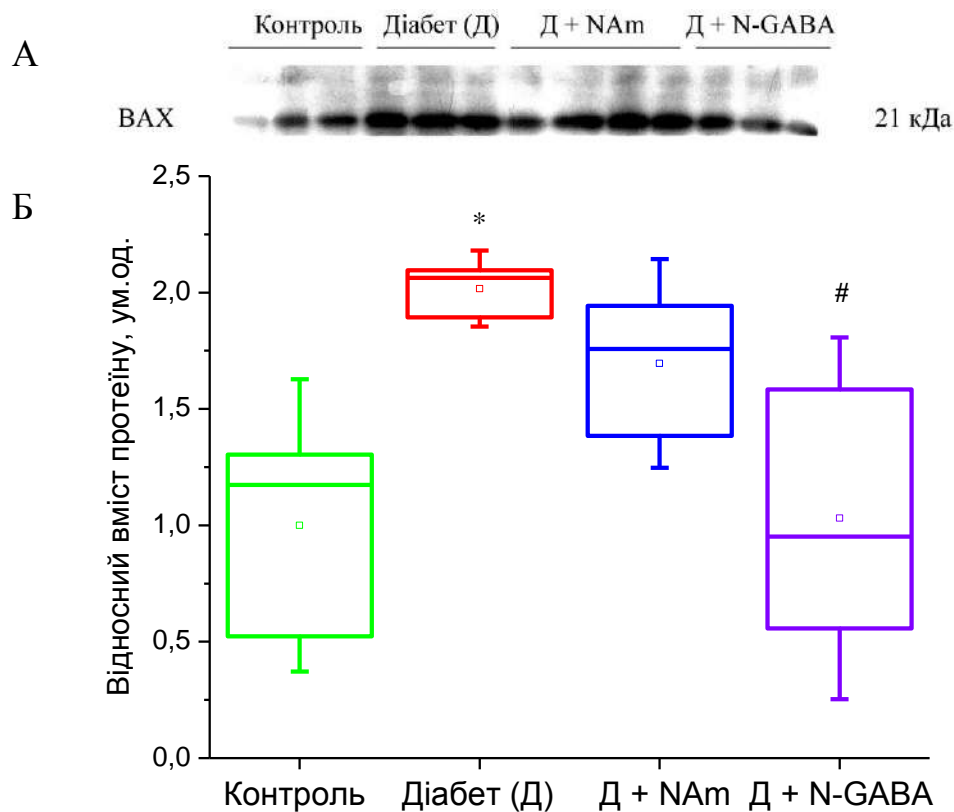


Рисунок 4.3. Вестерн-блот аналіз проапоптотичного протеїну BAX у тканині мозку щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б), $M \pm m$ ($n = 3-4$). * $P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”; # $P < 0,05$ порівняно з групою “Діабет”

Дослідження проведене Гао та його колегами показало, що гіпоксія може також призводити до апоптозу і пригнічувати проліферацію за нормального рівня глюкози, при гіперглікемії значно послаблюється індукована гіпоксією відповідь [195]. Тому високий рівень глюкози може

призвести до дисфункції ендотелію шляхом активації експресії ВАХ та зниженням регуляції Vc1-2 у пацієнтів хворих на діабет. При діабетичному кетоацидозі висока продукція лактату [196] може додатково посилити дисфункцію ендотелію за рахунок зниження кисню в тканинах мікрооточення [197].

Хронічне введення NAm призводить до незначного зниження вмісту ВАХ (1,19 рази), а N-GABA знижує цей показник у 1,96 рази, порівняно з діабетичною групою [193].

Зниження вмісту ВАХ у гіпокампі та корі за лікування NAm було показано іншими дослідниками за хвороби Альцгеймера [198]. Влив N-GABA на зміни вмісту ВАХ вперше досліджений нами за цукрового діабету у тканині мозку, для якого підтримання рівня ГАМК на фізіологічному рівні є дуже важливим [199].

Цереброваскулярна дисфункція, індукована ЦД, може бути також пов'язана зі зміною продукції вазодилаторів, які підтримують мозковий кровообіг за фізіологічних умов. За цих індукованих діабетом змін було оцінено вміст nNOS, експресія якої в основному відбувається в нейронах гіпоталамусу та епіфізу. Як було описано нами в розділі раніше за ЦД 1 типу відбувається активація поліолового шляху обміну глюкози в мозку [189], що не дає можливості мозку індукувати експресію nNOS. У мозку діабетичних щурів вміст nNOS знижувався у 1,38 рази, в той час як за впливу NAm або N-GABA вміст nNOS підвищувався у 1,85 та 1,32 рази відповідно, порівняно з діабетичною групою тварин (рис.4.4) [193]. Зниження вмісту nNOS за ЦД 1 типу спостерігали й інші дослідники [200].

Порушення nNOS-залежних відповідей може бути пов'язано із тим, що збільшення продукування супероксидного аніону може пригнічувати доступність нітроген (II) оксиду шляхом прямої його інактивації (з утворенням пероксинітриту) або окисленням тетрагідробіоптерину, що призводить до структурного роз'єднання димерної форми NOS. Крім того, можливо, що супероксидний аніон може інгібувати

диметиларгініндиметиламіногідролазу (DDAH), ензим, який гідролізує ендогенний інгібітор NOS асиметричний диметиларгінін (ADMA) [201].

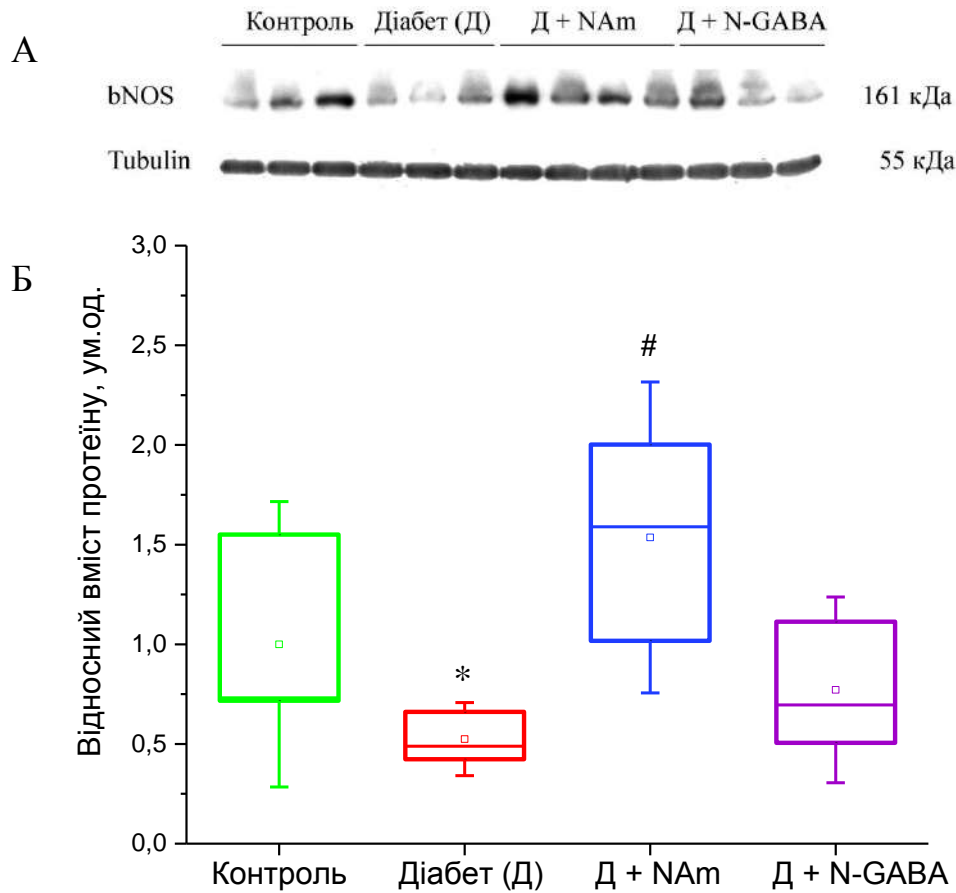
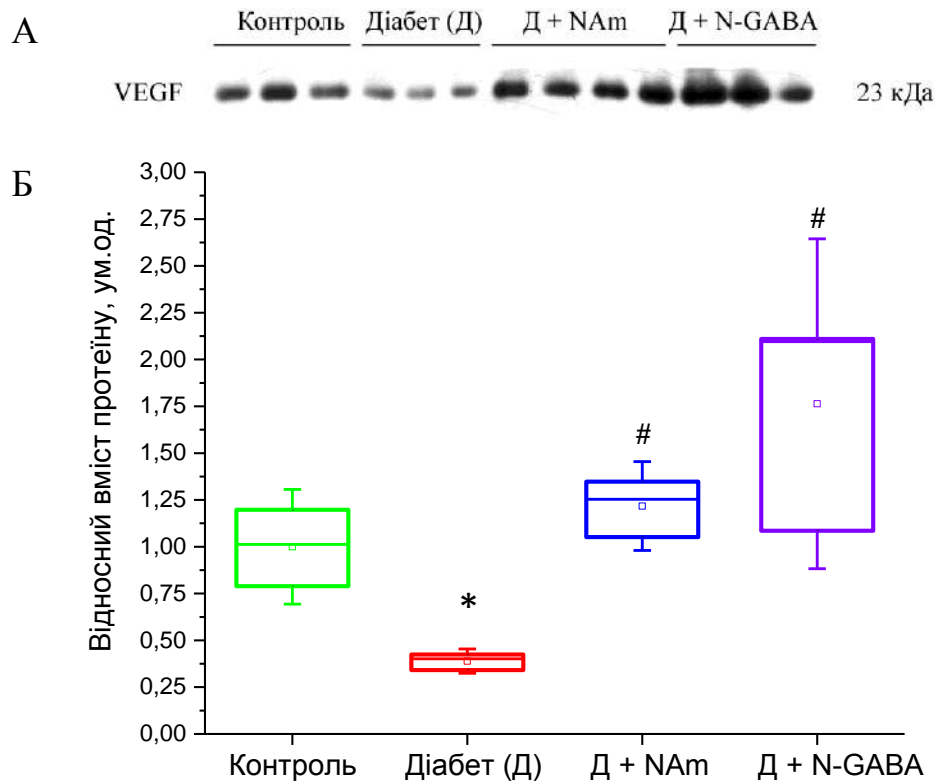


Рисунок 4.4. Вестерн-блот аналіз протеїну нейрональної NO-синтази у тканині мозку щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б), $M \pm m$ ($n = 3-4$). * $P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”; # $P < 0,05$ порівняно з групою “Діабет”

Фактор росту ендотелієвих клітин судин є ключовим регулятором множинних аспектів структури і функції кровоносних судин, але останні дані свідчать про те, що VEGF також має прямий вплив на нервові клітини. Порушення регуляції експресії VEGF призводить до низки нейродегенеративних розладів, включаючи дегенерацію мотонейронів [202]. Тому важливо було оцінити його вміст у мозку. Ми встановили, що вміст VEGF у мозку діабетичних щурів знижувався в 2,57 рази порівняно з контрольною групою і нормалізувався при застосуванні NAm (в 3,13 рази), що свідчить про його позитивний вплив на ангіогенну відповідь, дія N-

GABA була більш вираженою – вміст VEGF підвищувався у 4,53 рази порівняно з діабетичною групою (рис.4.5) [193, 203].



*Рисунок 4.5. Вестерн-блот аналіз протеїну фактору росту ендотелійних клітин судин у тканині мозку щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б), $M \pm m$ ($n = 3-4$). * $P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”; # $P < 0,05$ порівняно з групою “Діабет”*

Існують дані, що хворі з нейродегенеративним захворюванням мають більш низькі рівні експресії VEGF у сироватці крові і більш низькі рівні експресії VEGF у головному мозку у верхній скроневій частині кори, гіпокампі і стовбурі мозку, що є свідченням порушення функцій капілярів при цьому захворюванні, та може викликати його патогенез [204]. Нещодавні генетичні дослідження показали, що знижені рівні VEGF можуть викликати нейродегенерацію, частково за рахунок порушення перфузії нервової тканини за ішемії-реперфузії [205].

Відкладення аморфних речовин у стінці судин і потовщення базальної мембрани [205, 206] може призводити до звуження судин, втрати

вазорегуляції, гіперперфузії та порушення дифузії кисню до нервової тканини.

Існують дані, що нейродегенеративні захворювання супроводжуються розвитком реактивного гліозу за рахунок підвищення вмісту і деградації GFAP у тканині мозку [207-209]. Тому ми вирішили з'ясувати, чи не відбуваються зміни вмісту і деградація GFAP у тканині мозку за ЦД 1 типу. Нами було показано, що у мозку діабетичних щурів вміст GFAP підвищувався у 1,71 рази, що може свідчити про розвиток реактивного астроцитозу (рис. 4.6) [203]. Деякі механізми можуть пояснювати реакцію астроцитів за цукрового діабету, викликаному стрептозотоцином. Ці механізми включають підвищення активації поліолового шляху, глікозилювання протеїнів, порушений гомеостаз кальцію і оксидативний стрес. Існують дані, що збільшення вмісту GFAP та продуктів його деградації є реакцією астроцитів на оксидативний стрес [210].

Застосування NAm не призводило до зниження вмісту GFAP в мозку діабетичних щурів [203]. Однак, вплив N-GABA на вміст цього протеїну був навіть більш вираженим, ніж за діабету (збільшення в 1,70 рази). Оскільки за введення N-GABA також було виявлено підвищення вмісту віментину (у 2,39 рази порівняно з контрольною групою тварин), рис.4.8, який є важливим цитоскелетним структурним протеїном і характерний для попередників астроцитів або проліферуючих астроцитів, які є імунореактивними для GFAP та віментину, це може вказувати на проліферацію астроцитів та захисну реакцію мозку від можливого пошкодження клітин і метаболічних дисфункцій, індукованих діабетом. Ми не спостерігали змін вмісту віментину в мозку діабетичних тварин та діабетичних тварин, яким вводили NAm порівняно з контролем. Літературних даних не має, які б демонстрували дію цих сполук на вміст віментину.

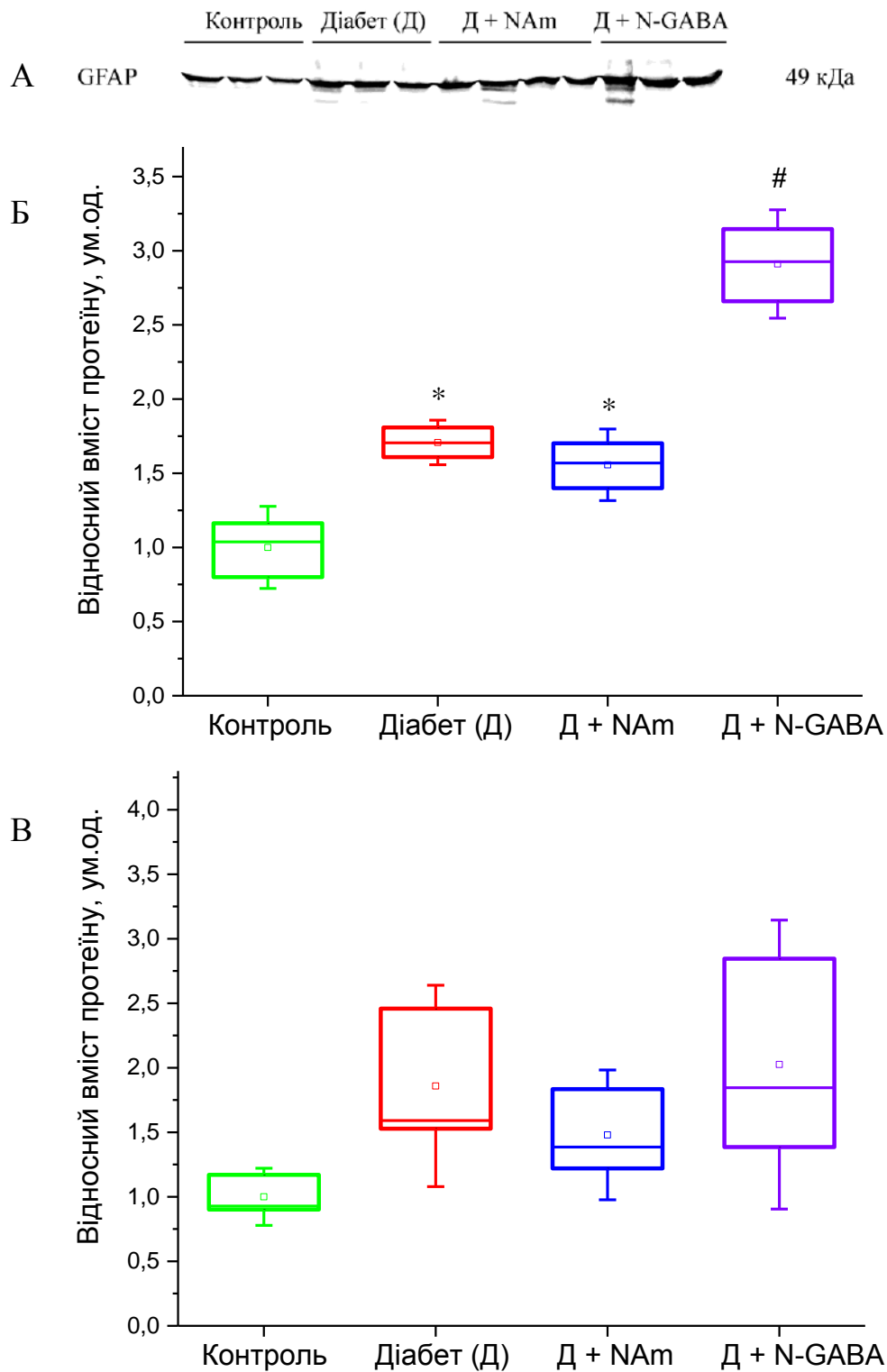


Рисунок 4.6. Вестерн-блот аналіз аналіз кислого гліального фібрилярного протеїну та його фрагментів у тканині мозку щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б-загальний вміст GFAP, В-фрагменти деградації), $M \pm m$ ($n = 3-4$). * $P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”; # $P < 0,05$ порівняно з групою “Діабет”

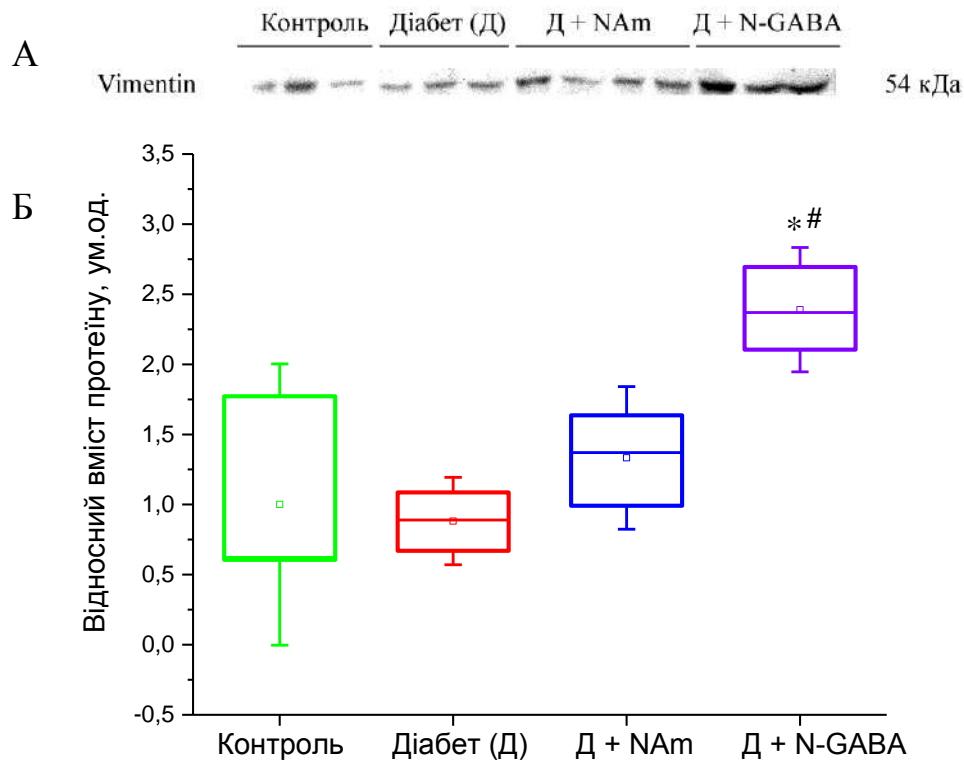


Рисунок 4.8. Вестерн-блот аналіз протеїну віментину у тканині мозку щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б), $M \pm m$ ($n = 3-4$).

* $P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”; # $P < 0,05$ порівняно з групою “Діабет”

Наші імуногістохімічні дослідження кризрізів мозку досліджуваних груп тварин узгоджуються з результатами Вестерн-блот аналізу GFAP головного мозку. Зображення фіксованих зрізів головного мозку продемонструвало підвищений рівень GFAP-імунофарбування в головному мозку щурів з діабетом в порівнянні з контрольною групою. Такі відмінності між імунореактивністю GFAP у діабетичному мозку можуть вказувати на те, що гіперглікемія призводить до розвитку гліозу у клітинах Мюллера. Хронічне введення NAm діабетичним щурам не впливало на імунореактивність GFAP в головному мозку, в той час як N-GABA збільшував інтенсивність GFAP-імунофарбування (рис. 4.7). Проведені раніше дослідження нашої групи показали, що NAm здатен знижувати вміст GFAP та його фрагментацію у ретині діабетичних щурів [211].

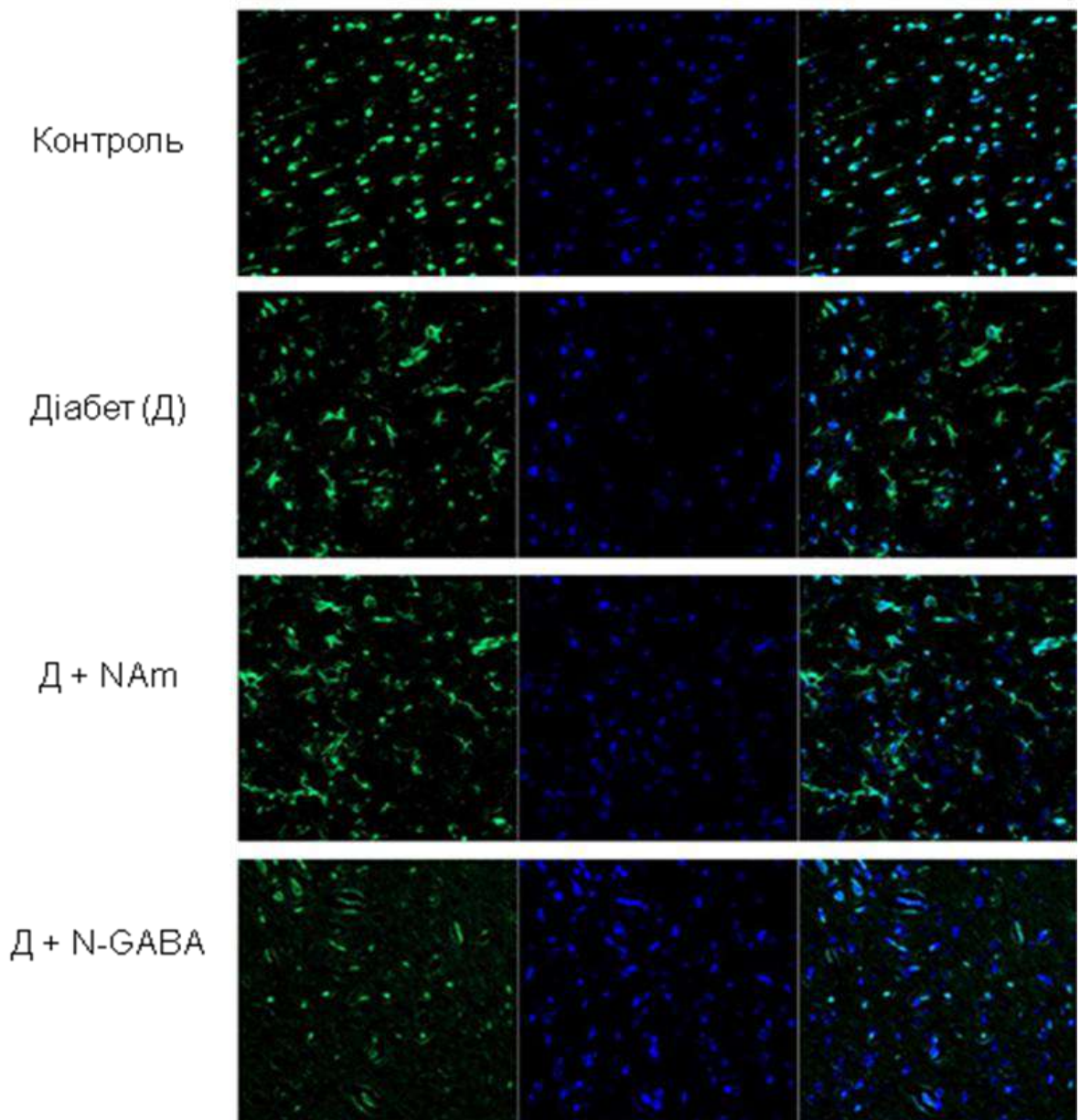


Рисунок 4.7. Імуногістохімічний аналіз кріозрізів мозку щурів за умов ЦД I типу. Зрізи оброблені антитілами проти GFAP (зелений колір) та ядра профарбовані флуоресцентним барвником Hoechst-33342 (синій колір), конфокальна мікроскопія

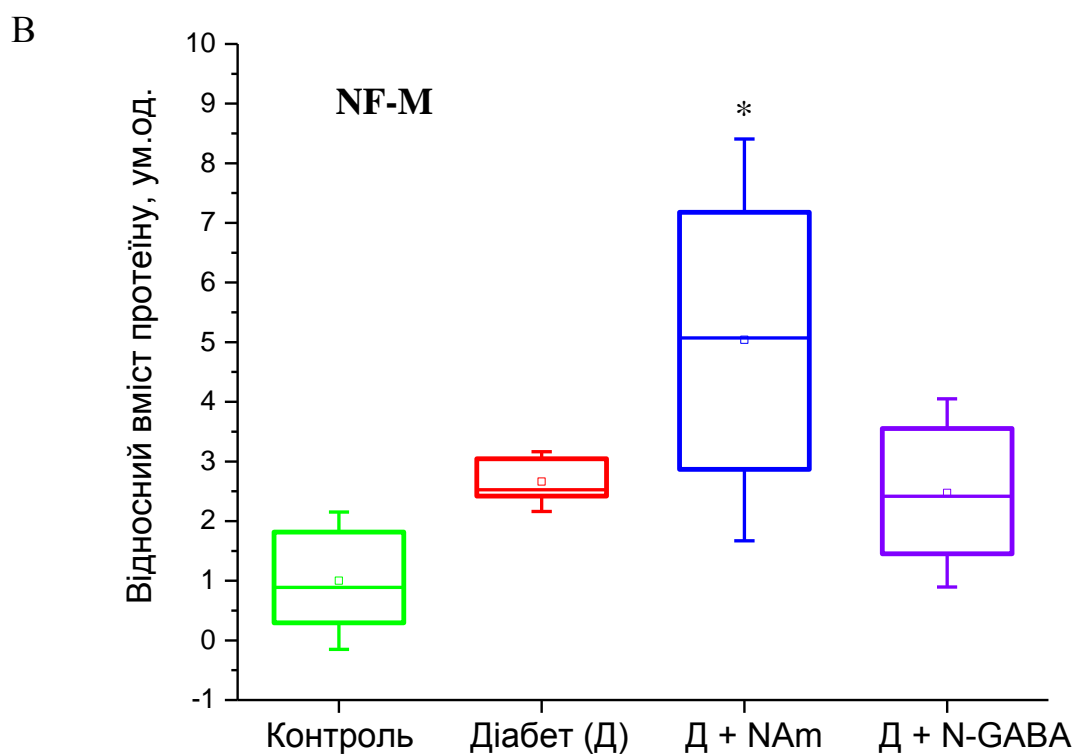
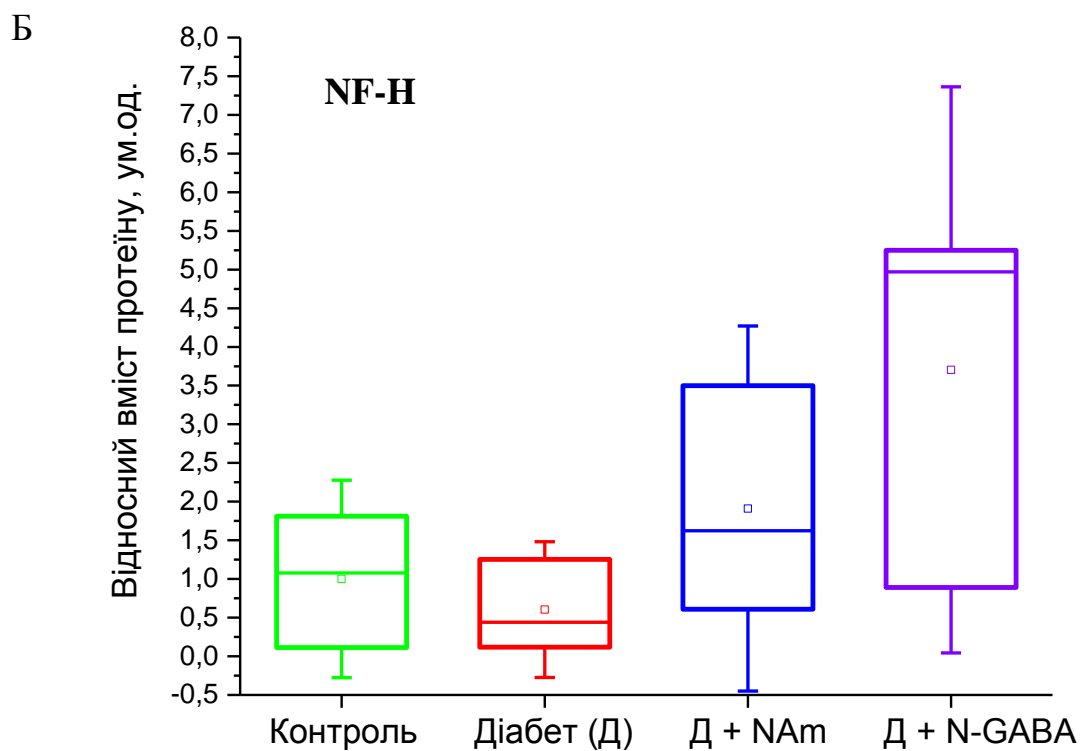
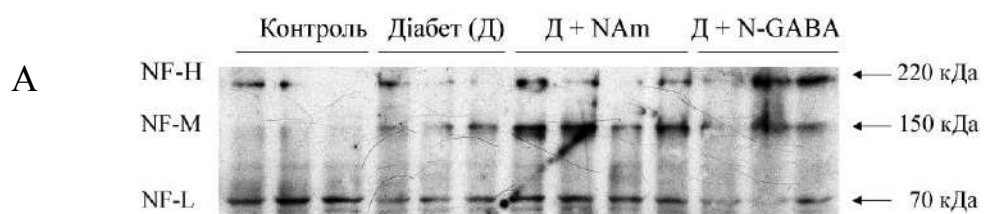
Вважають, що протеїни нейрофіламентів (NF) є високоспецифічними до пошкодження нейронів та їх загибелі, тому вони можуть бути біомаркерами при нейродегенеративних, запальних, судинних і травматичних захворюваннях [213]. Ми вважали доцільним оцінити вміст субодиниць триплету протеїнів нейрофіламентів. Отримані дані показали, що відбувається зниження вмісту протеїну нейрофіламентів легкого ланцюга (NF-L) в 1,80 рази і важкого ланцюга (NF-H) в 1,66 рази у мозку

діабетичних щурів, при цьому вміст протеїнів нейрофіламентів середнього ланцюга (NF-M) збільшувалося в 2,66 рази порівняно з відповідним показником контрольних тварин (рис.4.9).

Існують дані, що у нейронах у довготривалих діабетичних моделях спостерігали прогресуючу нездатність синтезувати всі три нейрофіламентні субодиниці, а отже, експортувати триплетні протеїни нейтрофіламенту. Всі ці дані свідчать про те, що ці зміни нейрофіламентів є центральними для розвитку діабетичної нейропатії [214, 215].

Застосування NAm викликало підвищення вмісту NF-H у 1,91, NF-M у 1,89 і NF-L у 1,63 рази порівняно з діабетичною групою [203]. Лікування N-GABA викликало більш помітне збільшення вмісту NF-H (у 6,14 рази), але він не впливав на вміст протеїнів NF-L і NF-M порівняно з діабетичною групою (рис.4.9).

Визначений нами загальний вміст трьох субодиниць протеїнів нейрофіламентів також продемонстрував, що відбуваються зміни у синтезі протеїнів нейрофіламентів, що узгоджуються з даними імуногістохімії (рис. 4.10.). Протеїни нейрофіламентів набувають все більшої уваги у зв'язку з можливістю їх використання в якості біомаркерів нейроаксонального пошкодження при нейродегенеративних захворюваннях.



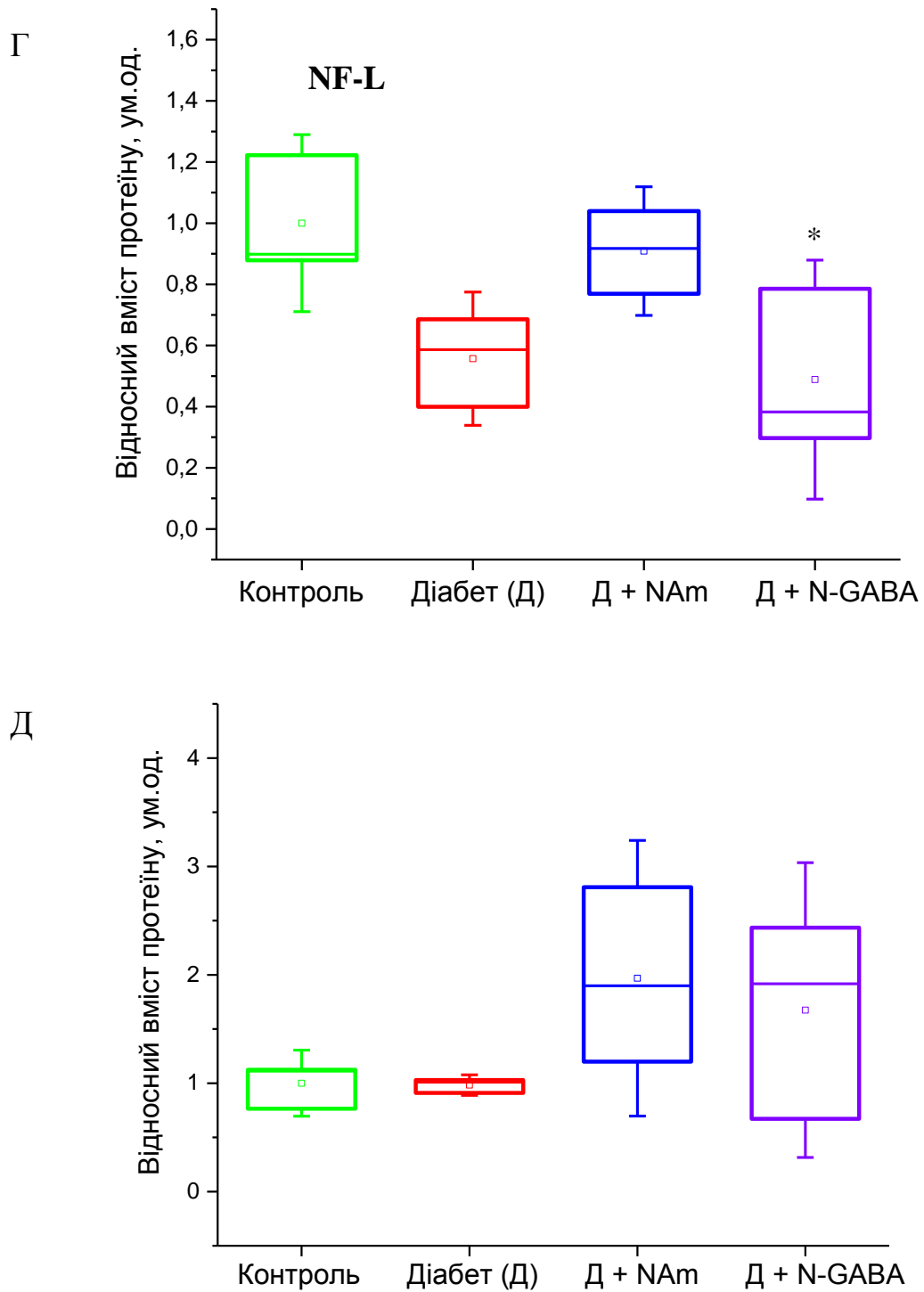
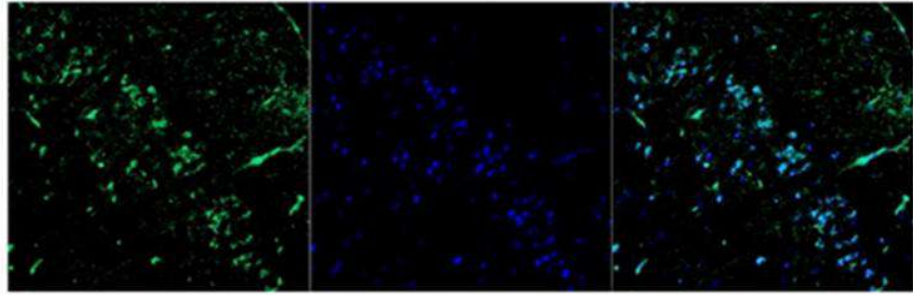
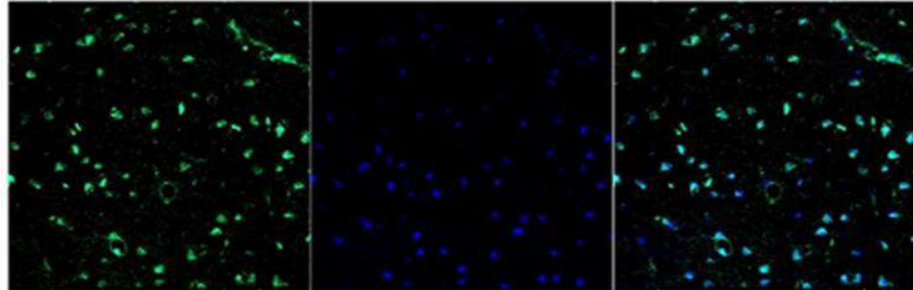


Рисунок 4.9. Вестерн-блот аналіз протеїнів нейрофіламентів у тканині мозку щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б-NF-H, В-NF-M, Г-NF-L, Д-загальний вміст NF), $M \pm m$ ($n = 3-4$).
* $P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”

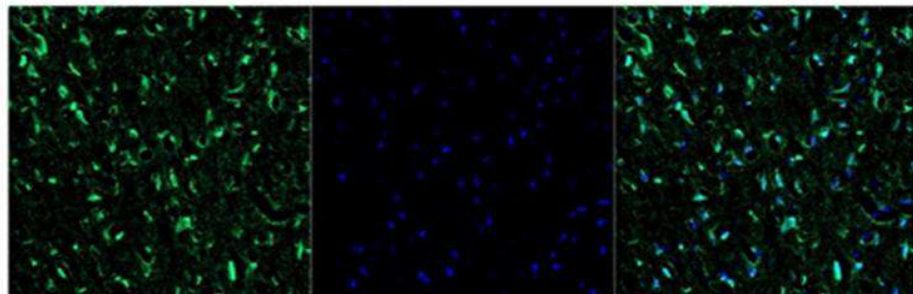
Контроль



Діабет (Д)



Д + NAm



Д + N-GABA

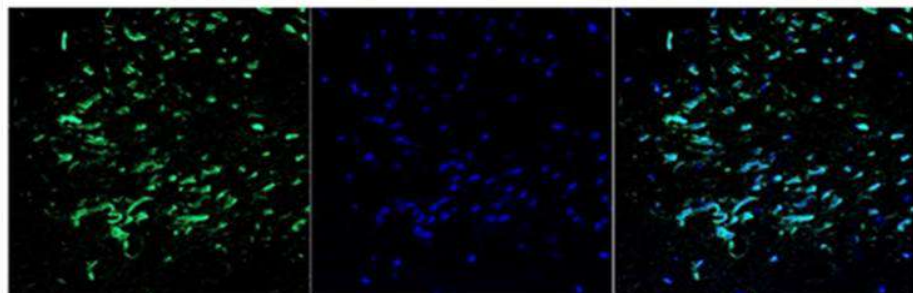


Рисунок 4.10. Імуногістохімічний аналіз криозрізів мозку щурів за умов ЦД I типу. Зрізи оброблені антитілами проти протеїнів нейрофіламентів (зелений колір) та ядра профарбовані флуоресцентним барвником Hoechst-33342 (синій колір), конфокальна мікроскопія

До порушень функціонування мозку можуть призводити зміни в структурі мієліну, основним структурним компонентом якого є основний протеїн мієліну, який експресується виключно в мієлінізуючій глії ЦНС. Отримані дані показали, що порівняно з контрольною групою, вміст МВР у мозку діабетичних щурів був знижений на 46,2% ($P < 0,05$) (рис. 4.11.), що

узгоджується з даними інших дослідників [89, 216]. Вміст MBP у мозку діабетичних щурів за лікування NAm не відрізнявся від такої як у діабетичній групі ($P > 0,05$). При цьому лікування N-GABA мало потенційну терапевтичну ефективність, оскільки відбулося незначне відновлення вмісту MBP у 1,42 рази порівняно з групою діабетичних щурів.

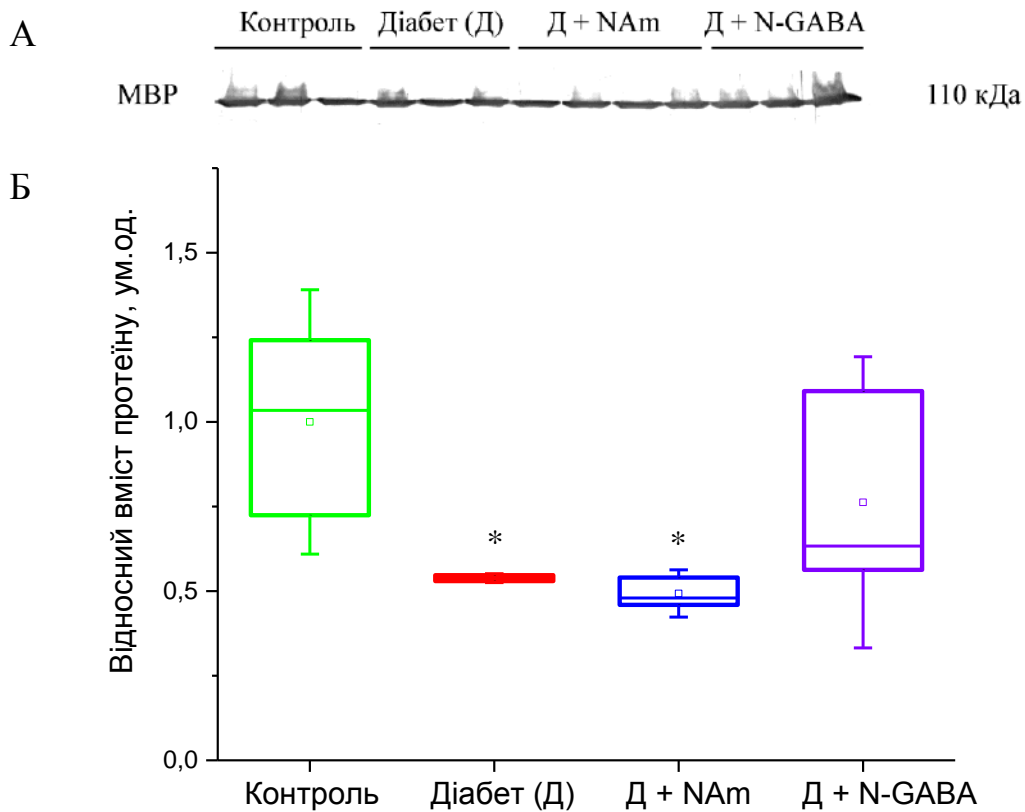


Рисунок 4.11. Вестерн-блот аналіз основного протеїну мієліну у тканині мозку щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б), $M \pm m$ ($n = 3-4$). * $P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”

Оскільки нами були виявлені зміни в мозку, то не виключено, що порушення можуть супроводжуватися втратою астроцитарної структурної цілісності, дезінтеграції гематоенцефалічного бар'єру. Тому було також оцінено в сироватці крові вміст GFAP та протеїну нейрофіламентів легкого ланцюга. GFAP є високоспецифічним для мозку, оскільки відповідні екстрацеребральні джерела цього протеїну не були ідентифіковані [217]. Як наслідок, рівень GFAP в крові у здорових людей дуже низький [218]. Пошкодження аксонів призводило до вивільнення протеїну NF-L у

спинномозкову рідину і, в кінцевому результаті, у кров. Більш високі рівні протеїну NF-L, як вважають, представляють більш виражену церебральну дегенерацію аксонів. За ЦД спостерігали підвищення рівня GFAP та протеїну NF-L у сироватці крові у 3,57 та 5,6 разів відповідно, порівняно з групою контроль (рис. 4.12, 4,13), що може бути свідченням того, що відбувається пошкодження аксонів та порушення проникності гематоенцефалічного бар'єру. Існують дані, що нейродегенеративні захворювання супроводжуються підвищенням рівня GFAP та протеїну NF-L у крові [219-221].

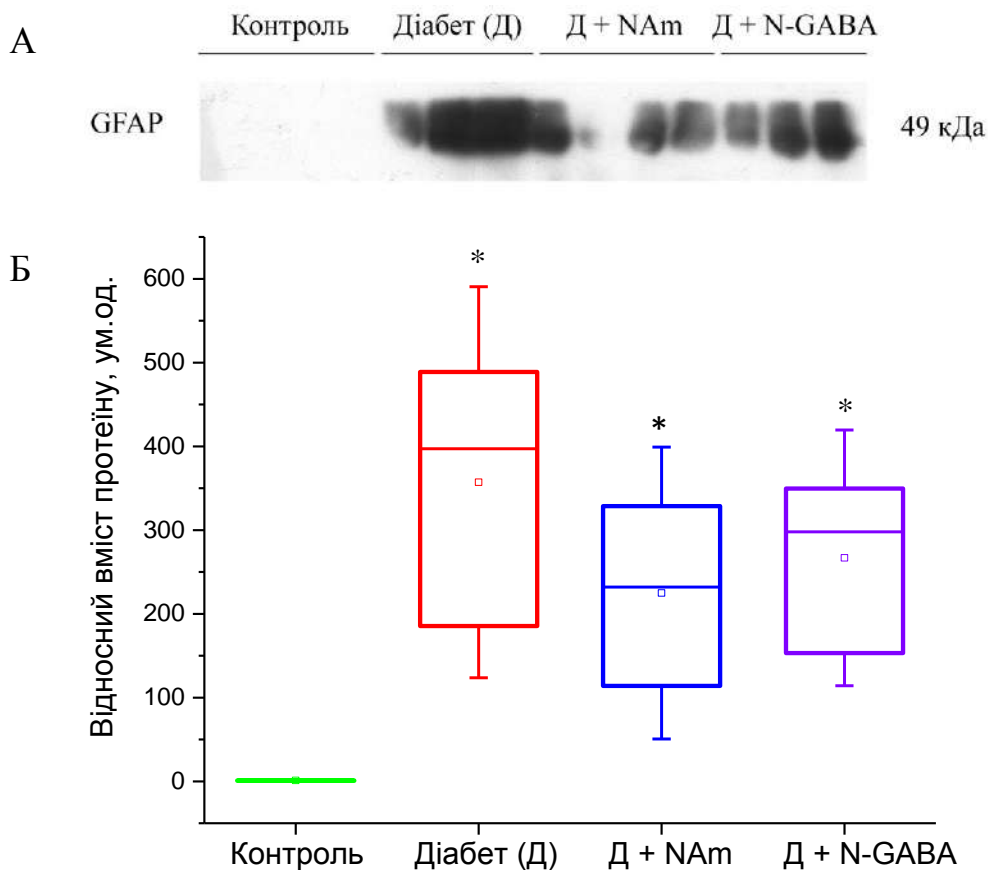


Рисунок 4.12. Вестерн-блот аналіз кислого гліального фібрилярного протеїну у сироватці крові щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б), $M \pm m$ ($n = 3-4$). $*P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”

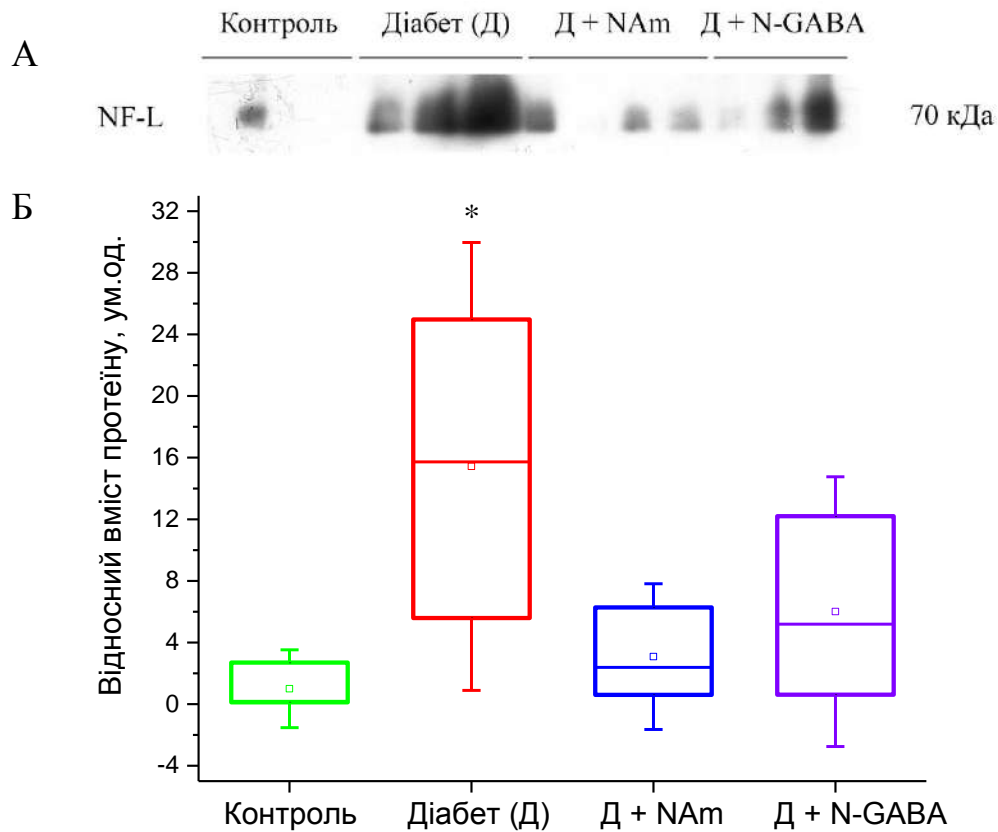


Рисунок 4.13. Вестерн-блот аналіз протеїну нейрофіламентів легкого ланцюгу у сироватці крові щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б), $M \pm m$ ($n = 3-4$). $*P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”

Застосування NAm або N-GABA призводило до зниження вмісту GFAP в 1,6 та 1,3 рази, а також вмісту протеїну NF-L у 5,0 та 2,6 рази відповідно для цих сполук у сироватці крові діабетичних щурів. Нами було вперше продемонстровано дію NAm та N-GABA на вміст GFAP та протеїну NF-L у сироватці крові за ЦД 1 типу.

Відомо, що у виживанні клітин і регуляції клітинного циклу, апоптозу, контролі експресії генів, репарації ДНК, відповіді на стійкість до геному і аутофагії, важливу роль відіграють сіртуїни, які залучені до регуляції цих ключових процесів [222]. Тому було оцінено чи відбуваються зміни за рахунок порушення експресії сіртуїнів. Вестерн-блот аналіз продемонстрував пригнічення регуляції експресії SIRT1 в ядрах мозку діабетичних щурів порівняно з контрольною групою. Зниження вмісту SIRT1 в мозку діабетичних щурів може вказувати на порушення його

регуляторного впливу на посттрансляційну модифікацію таких протеїнів як гістони і негістонів у відповідь на клітинний стрес, індукований ЦД, а також на процес диференціювання нейрональних клітин-попередників. Згідно з даними літератури, активація експресії SIRT1 може ефективно впливати на нейрони головного мозку, оскільки її активація захищає нейрони від β -амілоїд-індукованої токсичності через інгібування сигналізації NF- κ B в мікроглії [223]. Введення NAm діабетичним щурам призводило до незначного збільшення вмісту SIRT1. Проте, незначний вплив NAm на підвищення вмісту SIRT1 може мати захисний ефект на метаболічні процеси в мозку, змінені за ЦД 1 типу, що може призводити до продовження тривалості життя [224]. Не виключено, що навіть незначне підвищення вмісту SIRT1, в свою чергу, може призвести до активації 5'-AMP-активованої протеїнкінази, яка контролює споживання енергії при фізіологічних і патологічних станах [225]. У той же час було виявлено більш ніж триразове збільшення вмісту NAD-залежної деацетилази SIRT2 у діабетичних групах порівняно з контролем, підвищений вміст якого є одним з перших маркерів розвитку нейродегенеративних процесів у мозку [226]. Надекспресія SIRT2 може бути пов'язана з клітинним циклом у мозку і може реагувати на пошкодження ДНК, індуковане діабетом, оскільки для SIRT2 була виявлена як активність деацетилази, так і моно-ADP-рибозилтрансферази [227, 228]. Після введення NAm діабетичним щурам вміст SIRT2 дещо знижувався. Також було показано, що NAm підвищував вміст NAD^+ і сприяв відновленню функцій мозку [229]. Оскільки PARP-1, SIRT1 і SIRT2 є NAD-залежними, то цілком очевидно, що вони можуть конкурувати за доступність NAD^+ , зменшуючи не тільки його вміст, але і співвідношення вільних NAD/NADH пар у клітинах. Саме тому було доцільним оцінювати співвідношення вільних пар NAD/NADH у мозку, оскільки воно відображає метаболічний стан окислених і відновлених субстратів, що пов'язано з двома аспектами клітинного метаболізму: визначенням напрямку зворотних реакцій і оцінкою зміни вільної енергії

при позаклітинній оксидоредукції (наприклад, перенесення електронів з NADH до флавопротеїнів у транспортній ланцюзі електронів [164, 230].

Вміст NAD у мозку знижувався на 46% порівняно з показниками контролю, що може свідчити як про порушення його біосинтезу в результаті недостатності його попередників (було виявлено зниження вмісту триптофану на 62% в головному мозку щурів із ЦД 2 типу) [231], так і про використання його пулу на реалізацію інших NAD-залежних процесів (зокрема, рибозилування протеїнів тощо), які активуються за діабету [232]. Тому не виключено, що співвідношення вільних NAD/NADH пар також буде змінено, а його підтримка дуже важлива. Дійсно, ми спостерігали зміни рівноважних концентрацій метаболітів, які призводили до зменшення співвідношення вільних NAD/NADH пар у мозку діабетичних щурів до 60,1 проти 186,2 у контролі. Аналогічні зміни у мозку щурів були також виявлено нами на моделі експериментального ЦД 2 типу, а саме співвідношення вільних NAD⁺/NADH пар становило 122±18 за діабету у порівнянні із 212±22 у контролі [196]. Такі зміни в окисно-відновному стані можуть призвести до порушень в динамічній рівновазі між окисненням глюкози в NAD-залежному гліколізі і NADPH-залежним пентозофосфатним шляхом і посиленням розвитку діабетичної енцефалопатії. Введення NAM діабетичним щурам призводило до незначного збільшення співвідношення вільних пар NAD/NADH в головному мозку до 107,5, що може призвести до посилення процесів окислення і ампліфікації NAD⁺-залежного шляху SIRT1 в мозку, що призводить до підвищення чутливості до інсуліну і гомеостазу глюкози. Слід зазначити, що наші висновки узгоджуються з результатами, що стосуються хвороби Паркінсона, що не виключає загальних механізмів розвитку нейродегенеративних процесів в нервовій системі [233].

Ці дані дають змогу зрозуміти, що як SIRT1, так і SIRT2 відіграють важливу роль у функціонуванні мозку і зміни їх експресії, викликані

діабетом, призводять до дисфункцій мозку, які можуть супроводжуватися розвитком когнітивних порушень. Однак, результати цього дослідження показали, що NAM може частково коригувати експресію сіртуїнів і підвищити окисно-відновний стан в мозку діабетичних щурів.

Відомо, що за багатьох патологій, як генетично детермінованих, так і набутих, відбуваються суттєві зміни у перебігу метаболічних процесів, які супроводжуються порушеннями функцій мітохондрій. Тому нами було проведено дослідження на ізольованих мітохондріях нервових закінчень мозку інтактних щурів. Було виявлено, що СТЗ у концентрації 1 ммоль/л призводив до підвищення мітохондрійної дегідрогеназної активності практично у 2,2 рази, у той час як за його концентрації 0,05 ммоль/л - у 1,8 рази і за 0,01 ммоль/л – у 1,5 рази порівняно з контролем. Предінкубація 1 ммоль/л СТЗ протягом 15 хв при 37 °С і наступною дією 1 ммоль/л NAM протягом 15 хв при 37 °С підвищувала мітохондрійну активність у 1,8 рази порівняно із контролем, тобто NAM пригнічував дію СТЗ за використаної його концентрації, однак сам NAM підвищував активність у 1,6 рази порівняно із контролем. Предінкубація мітохондрій із 1 ммоль/л NAM із наступним внесенням 1 ммоль/л СТЗ призводила до збільшення активності у 1,6 рази, а предінкубація із 1 ммоль/л СТЗ, а потім внесення 1 ммоль/л NAM - у 1,8 рази. Ці дані дають підстави стверджувати, що NAM у концентрації 1 ммоль/л здатен частково відновити загальну дегідрогеназну активність мітохондрій, яка змінювалася за дії СТЗ, тим самим, проявляючи протекторну дію. При преінкубуванні СТЗ у концентраціях 0,05 ммоль/л та 0,01 ммоль/л, та наступному додаванні 1 ммоль/л NAM мітохондрійна дегідрогеназна активність була у 1,5 разу більша від контролю. Згідно з цими даними, можна вважати, що дія СТЗ на мітохондрійну дегідрогеназну активність нервових закінчень є дозозалежною. [234].

4.3. Перебіг досліджуваних патогенетичних процесів у нирках за ЦД 1 типу

За гіперглікемії зміни у судинах досить часто супроводжуються ураженнями ниркових клубочків навіть на рівні клітин. Так, за умов порушення функціонування нирок знижується їх клубочкова фільтрація, що призводить до розвитку мікроальбумінурії. Наявність мікроальбумінурії є найбільш важливим клінічним маркером для виявлення вже на ранніх етапах розвитку нефропатії [235, 236]. У виникненні порушень функціонування нирок за розвитку діабетичної нефропатії значну роль також відіграє активація поліолового шляху обміну глюкози внаслідок накопичення в клітинах нирок сорбітолу [237]. Як і припускалося, нами було виявлено зниження співвідношення вільних NAD/NADH та NADP/NADPH пар у тканині нирок діабетичних щурів у порівнянні з контрольною групою на 32% та 38% відповідно, (Табл.4.6). Застосування нікотинаміду з метою корекції метаболічних порушень призводило до часткової нормалізації досліджуваних показників. Позитивний ефект нікотинаміду при його введенні діабетичним щурам продемонстрували також інші автори, які виявили пригнічення біосинтезу сорбітолу [238], а також його цитопротекторну дію на клітини мозку [239].

Нами було виявлено, що у тканині нирок діабетичних щурів вміст NAD знизився на 31%, (табл.4.6.).

На тлі гіперглікемії та метаболічних змін у нирках, що супроводжувалися зниженням вмісту NAD і співвідношення вільних NAD/NADH пар було виявлено підвищення вмісту альбуміну у добовій сечі діабетичних тварин у 2,9 рази, що свідчить про розвиток мікроальбумінурії

Введення нікотинаміду діабетичним щурам призводило до зниження вмісту альбуміну у сечі на 29% (рис. 4.15), що може бути результатом його коригувальної дії як попередника біосинтезу NAD та інгібітора полі-ADP-рибозополімерази, яка активується за цукрового діабету, що викликає

руйнування клітин за діабетичної ретинопатії та енцефалопатії, як показано нами [211, 240].

Таблиця 4.6. Вміст NAD і співвідношення NAD/NADH і NADP/NADPH у нирках щурів за діабетичної нефропатії (мкмоль/г, $M \pm m$, $n=8$)

Група	Контроль	Діабет (Д)	Д + NAm
NAD	0,261 ± 0,023	0,180 ± 0,012*	0,204 ± 0,015*#
NAD/NADH	297,012 ± 21,201	202,002 ± 16,101*	269,004 ± 17,104#
NADP/NADPH	0,013 ± 0,002	0,008 ± 0,001*	0,011 ± 0,0011#

Примітка: * $P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”; # $P < 0,05$ порівняно з групою “Діабет”

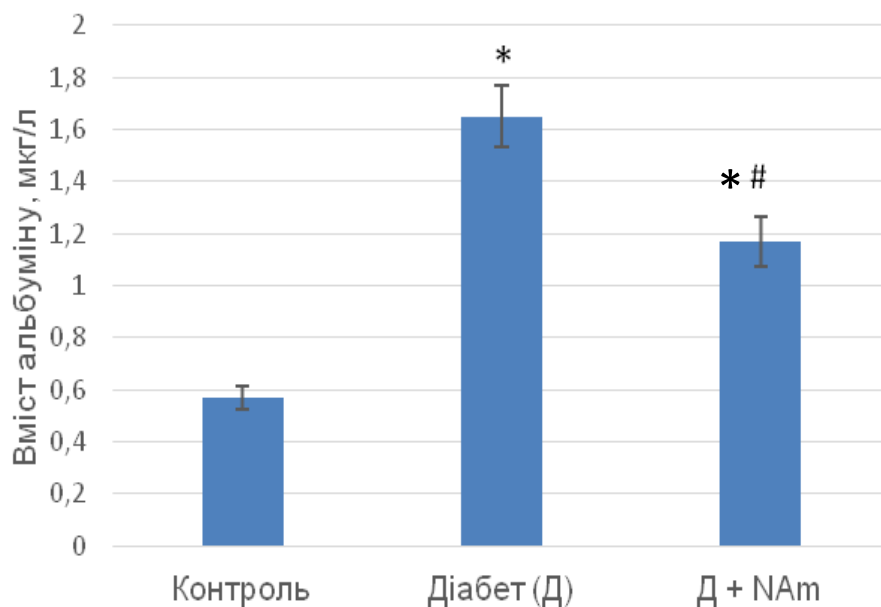


Рисунок 4.15. Вміст альбуміну у добовій сечі щурів за діабетичної нефропатії і корекції нікотинамідом (мкг/л, $n=8$), * $P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”; # $P < 0,05$ порівняно з групою “Діабет”

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що за діабетичної нефропатії відбуваються суттєві метаболічні та функціональні зміни у тканині нирок, які частково нормалізуються при застосуванні вітаміну B₃ (нікотинамід), який володіє широким спектром дії, що обґрунтовує

доцільність його використання при лікуванні цього ускладнення цукрового діабету [241].

Тривалий вплив гіперглікемії на клітини, тканини та органи організму проявляється на метаболічному, структурному та функціональному рівнях. Також до діабетичних ускладнень залучені численні патогенні фактори. Ці механізми включають оксидативний стрес, розвиток запальних процесів, дегенеративні та апоптотичні зміни, нейропатію, нефропатію, васкуляризацію, ендотелійну дисфункцію, порушення енергетичного обміну тощо. Ці фактори не є незалежними, але можуть мати потенціал прямого чи непрямого ефекту. Вітамін B₃ та його похідні можуть частково або повністю коригувати досліджувані патогенетичні процеси шляхом прямої або опосередкованої дії. У свою чергу, дія NAm може реалізуватися за рахунок його специфічної дії, як попередника біосинтезу нікотинамідних коензимів, призводячи до відновлення окисно-відновного стану та забезпечуючи необхідну координацію у функціонуванні численних метаболічних ензимів. Також не виключена дія вітаміну B₃ та його біологічно активного похідного і за інших механізмів. Так, можна припустити, що дія N-GABA може реалізуватися через ГАМК-ергічний рецепторний комплекс. Не виключено, що NAm та N-GABA можуть бути регуляторами процесів поглинання та вивільнення деяких медіаторів опосередкованого через NAD⁺. На нашу думку, можливість застосування нікотинаміду для лікування цукрового діабету буде мати позитивний ефект ще й тому, що він є антиоксидантним препаратом.

Отже, виявлення нових молекулярних механізмів, що є основою розвитку цукрового діабету та його ускладнень, відіграє важливу роль у патогенезі цього захворювання та дає можливість корекції цих метаболічних, структурних та функціональних порушень досліджуваними сполуками, що можуть бути основою для пошуку нових терапевтичних засобів для лікування цукрового діабету та його ускладнень.

Основні наукові результати розділу опубліковані в роботах:

1. Сергійчук ЮТ, **Тихоненко ТМ**, Кучмеровська ТМ. Сумісний вплив нікотинаміду, ацетил-L-карнітину та α -ліпоєвої кислоти на дисфункцію мозку щурів за цукрового діабету 2-го типу. The Ukrainian biochemical journal XI Український біхімічний конгрес. 2014, 86, 5(supplement 1) p.205.
2. Сергійчук ЮТ, **Тихоненко ТМ**, Гузик ММ, Яніцька ЛВ, Кучмеровська ТМ. Вплив сумісної дії нікотинаміду, ацетил-L-карнітину та α -ліпоєвої кислоти на окремі ланки обміну вуглеводів за експериментального діабету 2 типу. Біологічні студії. 2014; 8(3-4): 41-52.
3. Сергійчук ЮТ, Конопельнюк ВВ, **Тихоненко ТМ**, Кучмеровська ТМ. Корекція окремих ланок обміну серотоніну за експериментального цукрового діабету 2 типу. Ендокринологія. 2014; 19(3): 210-216.
4. Гузик ММ, Сергійчук ЮТ, **Тихоненко ТМ**, Яніцька ЛВ, Кучмеровська ТМ. Амінокислотний склад колагену і типу кісток за експериментального цукрового діабету: ефект нікотинаміду. Ендокринологія. 2014; 19(4): 289.
5. **Тихоненко ТМ**, Дякун КО, Яніцька ЛВ, Кучмеровська ТМ. Нейропротекторий вплив сумісної дії нікотинаміду, α -ліпоєвої кислоти та L-ацетил карнітину за експериментального цукрового діабету. Матеріали Третьої міжнародної конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”, 24-25 вересня, 2015 Дніпропетровськ. С. 83-84.
6. **Тихоненко ТМ**, Дякун КО, Сергійчук ЮТ. Мітохондріальна дегідрогеназна активність нервових закінчень мозку щурів. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2016; 73: 203-207.
7. Гузик ММ, Дякун КО, **Тихоненко ТМ**, Яніцька ЛВ, Кучмеровська ТМ. Вплив інгібіторів полі ADP-рибopolімерази-1 (PARP-1) на клітини підшлункової залози лінії RINm5f. Матеріали IV Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю “Хімія природних сполук”, Тернопіль, 21-22 квітня, 2016. С. 75-76.

8. Кучмеровська ТМ, Яніцька ЛВ, **Тихоненко ТМ**, Привроцька ІБ. Нефропротекторний ефект нікотинаміду при експериментальному цукровому діабеті. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2017; 78(2): 31-36.
9. Kuchmerovska TM, Ianitska LV, Guzyk MM, **Tykhonenko TM**, Pakyrbaeva LV, Dyakun KO. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibitors in correction of experimental diabetic neuropathy. Materials of VIII Lviv-Lublin conference of experimental and clinical biochemistry. (Lublin, 18-20 September, 2017). P. 26.
10. Яніцька ЛВ, **Тихоненко ТМ**, Гузик ММ, Кучмеровська ТМ. Участь поліолового шляху в розвитку дисфункцій мозку, індукованих експериментальним діабетом: ефект нікотинаміду. Ендокринологія. 2017; 22(3): 279-283.
11. Kuchmerovska TM, **Tykhonenko TM**, Guzyk MM, Tykhomyrov AO, Yanitska LV. Nicotinamide and Nicotinoyl-Gaba in Prevention of Experimental Diabetic Neuropathy. Jacobs journal of diabetes and endocrinology. 2018; 4(1).
12. Guzyk MM, **Tykhonenko TM**, Dyakun KO, Yanitska LV, Pryvrotska IB, Kuchmerovska TM. Altered sirtuins 1 and 2 expression in the brain of rats induced by experimental diabetes and the ways of its correction. Ukr.Biochem.J. 2019; 91(1): 21-29.
13. **Tykhonenko TM**, Tykhomyrov AO, Guzyk MM, Dyakun KO, Kuchmerovska TM. The effects of nicotinamide on the brain functional protein markers in prevention of diabetic neuropathy. Materials of 32nd ECNP (European College of Neuropsychopharmacology) Congress. Published in in supplement to the journal European Neuropsychopharmacology (Copenhagen, 7-10 September, 2019). Denmark, 2019, T. 29, supplement 6, P. s554-s555.
14. **Тихоненко ТМ**, Тихомиров АО, Гузик ММ, Дякун КО, Кучмеровська ТМ. 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), С. 242.

15. Kuchmerovska TM, **Tykhonenko TM**, Tykhomyrov AO, Guzyk MM. 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. Т. 21, 3(80), P. 202-203.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проведені дослідження дозволяють узагальнити та систематизувати отримані вперше та доповнити існуючі відомості щодо механізмів дії вітаміну B₃ та його похідних у досліджуваних клітинах *in vivo* та *in vitro*, а також у досліджуваних органах щурів за цукрового діабету та його ускладнень. Отримані результати дозволили розширити знання щодо ролі вітаміну B₃ та його біологічно активних похідних, а також з'ясувати ефективність їх дії як коригуючих засобів за функціональних метаболічних та структурних порушень, індукованих розвитком цього захворювання.

Було виявлено зростання рівня глюкози крові та зниження маси тіла у діабетичних щурів порівняно з контрольними тваринами, що підтверджує розвиток цієї патології. Введення діабетичним щурам протягом 14 діб NAm або N-GABA не призводило до зростання маси тіла тварин. Більше того, в той час як NAm не впливав на рівень глюкози у крові, то N-GABA прилявляв незначну гіпоглікемічну дію.

Нами було встановлено, що за гіперглікемії можуть відбуватися порушення навіть на рівні окремих клітин, що, в свою чергу, може викликати надпродукцію АФК в мітохондріях, зниження мітохондрійного мембранного потенціалу та порушення енергетичних процесів.

Нами виявлено у діабетичних тварин морфологічні зміни в підшлунковій залозі, які супроводжуються збільшенням кількості ушкоджених панкреатоцитів та вогнищевим ураженням в острівцях Лангергарса. Ці зміни у панкреатоцитах частково нормалізувались за хронічного введення NAm. Дослідження проведені на клітинній лінії RINm5f *in vitro* дозволили виявити, що висока концентрація глюкози (100 ммоль/л) призводила до зниження життєздатності клітин RINm5f, розвитку оксидативного стресу та зниження мембранного потенціалу мітохондрій. При цьому внесення у середовище інкубації NAm у концентрації 1 ммоль/л запобігало руйнівній дії глюкози. Тобто коригуючий ефект NAm за

дисфункції клітин може реалізуватися не тільки за рахунок його специфічної дії, як попередника синтезу NAD, але і завдяки впливу на продукування АФК і мембранний потенціал мітохондрій, що може супроводжуватися, принаймні частковим відновленням структурних та метаболічних функцій клітин.

Оскільки у розвитку запальних процесів важливу роль відіграють лейкоцити, як одна із ланок імунної системи, то за патологічних станів відповідь цих клітин буде змінюватися. Дійсно, нами встановлено, що за цукрового діабету життєздатність лейкоцитів крові знижується, а рівень оксидативного стресу підвищується, що, в свою чергу, призводить до змін у перерозподілі різних типів лейкоцитів та зниження мітохондрійного мембранного потенціалу. Отримані результати дозволили встановити, що при застосуванні NAm або N-GABA за ЦД 1 типу підвищувалась життєздатність лейкоцитів крові, знижувався рівень АФК, частково відновлювався перерозподіл основних типів лейкоцитів та підвищувався рівень мітохондрійного мембранного потенціалу, що свідчить про здатність цих сполук пригнічувати розвиток запальних процесів.

Більше того, нами показано, що за гіперглікемії були виявлені морфологічні зміни в ендотелійних клітинах EA.hy926 та зниження мембранного потенціалу у мітохондріях. Застосування нікотинамід у частково сприяло відновленню цих показників.

Нами було виявлено, що у діабетичних щурів відбуваються метаболічні та структурні порушення у сідничному нерві, що супроводжуються активацією поліолового шляху та структурними змінами, зокрема частковою демієлінізацією та фрагментацією нервових волокон, а також набряком волокон та зменшенням їх товщини. Застосування NAm або N-GABA пригнічувало активацію поліолового шляху обміну глюкози, а також частково запобігало структурним змінам у сідничному нерві діабетичних тварин.

Варто зазначити, що активація поліолового шляху обміну глюкози за гіперглікемії, індукованою ЦД 1 типу, відбувається також як у цільному мозку, так і в його окремих відділах, оскільки рівень сорбітолу накопичувався, що є доказом розвитку діабетичної енцефалопатії. При чому накопичення сорбітолу у мозку тварин варіює у різних його відділах. Введення NAm діабетичним щурам призводило до зниження вмісту сорбітолу у цільному мозку, а також у всіх досліджуваних його відділах, причому найбільш виражено у гіпокампі та мозочку.

За активації поліолового шляху обміну глюкози не виключено, що будуть відбуватися зміни навіть на молекулярному рівні клітин. Дійсно, результати досліджень свідчать про те, що на тлі діабетичної енцефалопатії відбувалися зміни вмісту ключових протеїнів. За даними Вестерн-блот-аналізу нами показано, що вміст транскрипційного ядерного фактора NF-κB збільшувався у мозку діабетичних щурів порівняно з контролем, що може індукувати зміни експресії генів, протеїни яких будуть посилювати запалення і оксидативний стрес, викликати апоптоз, що в свою чергу може призводити до індукованої оксидативним стресом клітинної дисфункції та навіть загибелі клітин. Хронічне введення NAm діабетичним щурам викликало незначне зниження вмісту NF-κB, тоді як вміст NF-κB більш помітно знижувався при застосуванні N-GABA. Було продемонстровано, що вміст проапоптичного протеїну BAX також підвищувався у діабетичній групі порівняно з контрольною групою. Така надекспресія протеїну BAX може призвести до мітохондрійної дисфункції і навіть призводити до апоптотичної загибелі клітин. Отримані результати показали, що хронічне введення NAm або N-GABA призводить до зниження вмісту BAX, при чому N-GABA мав більш виражений ефект.

Нами було виявлено, що стан судин мозку за ЦД також зазнає суттєвих порушень, оскільки вміст pNOS та VEGF за цих умов знижувався. Застосування NAm або N-GABA призводило до нормалізації даних показників, що може свідчити про їх коригуючу ангіогенну дію.

За виявленими нами порушень у мозку розвивається також реактивний гліоз, доказом чого було підвищення вмісту GFAP та продуктів деградації цього протеїну. Застосування NAm не призводило до зниження вмісту GFAP в мозку діабетичних щурів. Однак, N-GABA викликав підвищення вмісту цього протеїну у більшій мірі у порівнянні з діабетичною групою. Оскільки за введення N-GABA також було виявлено підвищення вмісту віментину, це може бути ознакою проліферації астроцитів та захисної реакції мозку від можливого пошкодження клітин і метаболічних дисфункцій, індукованих діабетом. У мозку діабетичних щурів та діабетичних щурів, яким вводили NAm не були виявлені зміни вмісту віментину.

Не виключено, що дисфункції у мозку за діабетичної нейропатії можуть бути також пов'язані з порушенням цитоскелету аксонів, за рахунок протеїнів нейрофіламентів, вміст яких найбільший в аксонах. При оцінці триплету субодиниць протеїнів нейрофіламентів NF-L, NF-M і NF-H у мозку діабетичних щурів нами були виявлені зміни у співвідношенні цих субодиниць, що може призводити до значних порушень структури та функцій аксонів. При чому NAm мав більш нормалізуючий ефект на вміст протеїнів NF-L та NF-H,

Важливо було з'ясувати, чи відбувається демієлінізація нервових волокон в мозку діабетичних щурів, як це було виявлено нами у сідничному нерві тварин. Як свідчать отримані нами дані вміст основного протеїну мієліну у мозку діабетичних щурів був знижений, порівняно з контрольною групою. Вміст MBP у мозку діабетичних щурів за введення NAm не відрізнявся з діабетичною групою. При цьому застосування N-GABA призводило до часткового відновлення вмісту MBP порівняно з групою діабетичних щурів.

Доказом того, що за ЦД 1 типу відбувається руйнування нейронів та порушується проникність гематоенцефалічного бар'єру є виявлені нами зміни на рівні цілого організму, так як вміст GFAP та протеїнів NF-L у

сироватці крові діабетичних щурів зростає. Хронічне застосування NAm або N-GABA призводило до часткового відновлення цих показників.

За результатами Вестерн-блот-аналізу було виявлено значне зниження вмісту SIRT1 в ядрах мозку діабетичних щурів порівняно з контрольною групою тварин. Введення NAm діабетичним щурам призводило до незначного збільшення вмісту SIRT1. У той же час було виявлено більш ніж триразове збільшення вмісту NAD-залежної деацетилази SIRT2 у діабетичних групах порівняно з контролем, підвищений вміст якого є одним з перших маркерів розвитку нейродегенеративних процесів у мозку. Після введення NAm діабетичним щурам вміст SIRT2 дещо знижувався.

Зниження вмісту NAD і співвідношення вільних NAD/NADH пар а також підвищення вмісту альбуміну у добовій сечі діабетичних тварин у 2,9 рази, що свідчить про розвиток мікроальбумінурії було виявлено нами у нирках тварин, що підтверджувало наявність нефропатії. Продемонстровано, що застосування NAm частково нормалізувало енергетичні процеси у досліджуваній тканині нирок діабетичних щурів, а також сприяло відновленню мікросудин клубочків і канальців нирок про що свідчить зниження вмісту альбуміну у добовій сечі тварин.

Результати проведених досліджень дозволяють стверджувати про наявність зв'язку між гіперглікемією, активацією оксидативного стресу, розвитком реактивного гліюзу та дисфункціями судин, апоптозом, демієлінізацією нейронів за розвитку діабетичної нейропатії. Нікотинамід та нікотиноіл-гаммааміномасляна кислота можуть частково або повністю коригувати ці процеси та показники. Отримані нами результати дозволили з'ясувати нові аспекти щодо механізмів реалізації дії вітаміну B₃ та його біологічно активних похідних, а також виявити ключові протеїни, експресія яких зазнає суттєвих змін за діабетичної енцефалопатії. Таким чином досліджувані сполуки можуть бути основою для пошуку нових терапевтичних засобів для лікування цукрового діабету та його ускладнень.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі було вперше досліджено здатність нікотинаміду та нікотиноїл-ГАМК реалізувати їх дію шляхом пригнічення проапоптотичних шляхів, модуляції експресії ангіогенних факторів, астрогліальної відповіді, а також впливаючи на цитоскелет і морфологічні зміни у нервових клітинах, індукованих ЦД.

1. Виявлено, що NAm та N-GABA проявляють антиоксидантну та протизапальну дію, а останній - також слабку гіпоглікемічну дію. Застосування NAm або N-GABA призводило до підвищення життєздатності лейкоцитів крові, зниження рівня АФК у лейкоцитах крові, відновлення рівноваги між гранулоцитами та агранулоцитами, зниження мітохондрійного мембранного потенціалу.

2. Продемонстровано, що NAm та N-GABA пригнічують активацію поліолового шляху обміну глюкози у сідничному нерві, вогнищевий набряк волокон, запобігають втраті мієлінових, оболонки, дегенерації окремих нервових волокон, підвищують, товщину нервового волокна та щільність нервових волокон сідничного нерва, запобігаючи його структурним змінам, які виникають за ЦД.

3. Встановлено, що за ЦД відбувається також активація поліолового шляху обміну глюкози у мозку, проте не так виражено як у сідничному нерві. Введення NAm діабетичним щурам призводило до зниження вмісту сорбітолу у цільному мозку, а також у всіх досліджуваних його відділах, причому найбільш виражено у гіпокампі та мозочку.

4. Встановлено, що на тлі діабетичної енцефалопатії відбуваються зміни вмісту протеїнів: зниження вмісту nNOS, VEGF, MBP, NF-L, NF-H, у той час як вміст NF-κB, BAX, GFAP, NF-M підвищувався, однак при цьому вміст віментину не змінювався. NAm та N-GABA проявляли коригуючий ефект на вміст nNOS, VEGF, NF-κB, BAX, при чому NAm мав більш нормалізуючий ефект на вміст протеїнів NF-L, NF-H, а N-GABA на вміст

МВР. Також показано, що введення N-GABA призводило до підвищення вмісту віментину та GFAP, що може бути результатом проліферації астроцитів як адапційно-захисної реакції.

5. Результати роботи свідчать про те, що гіперглікемія “запускає” суттєві зміни в ключових метаболічних процесах ЦНС та периферичної нервової системи, а застосування NAm та N-GABA обґрунтовує можливість їх ефективного використання у корекції індукованих діабетом порушень.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Nazarali SA, Kuzel P. Vitamin B Derivative (Nicotinamide) Appears to Reduce Skin Cancer Risk. *Skin Therapy Lett.* 2017; 22(5): 1-4.
2. Johnson S, Imai S. NAD⁺ biosynthesis, aging, and disease. *Version 1. F1000Res.* 2018; 7: 132.
3. Fricker RA, Green EL, Jenkins SI, Griffin SM. The Influence of Nicotinamide on Health and Disease in the Central Nervous System. *Int J Tryptophan Res.* 2018; 11: 1–11.
4. Kharroubi AT, Darwish HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World journal of diabetes.* 2015; 6(6): 850-867.
5. <https://www.idf.org/our-activities/congress/hyderabad-2018.html>.
6. Alam U, Asghar O, Azmi S, Malik RA. General aspects of diabetes mellitus. *Handb Clin Neurol.* 2014; 126: 211-22.
7. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res.* 2010; 107(9): 1058–1070.
8. Chen AC, Damian DL. Nicotinamide and the skin. *Australas J Dermatol.* 2014; 55(3): 169-75.
9. Combs GF. The vitamins. *Fundamental aspects in nutrition and health.* Elsevier Inc. 2018.
10. Wolak N, Zawrotniak M, Gogol M, Kozik A, Rapala-Kozik M. Vitamins B1, B2, B3 and B9. Occurrence, Biosynthesis Pathways and Functions in Human Nutrition. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* 2017; 17(12): 1075-111.
11. Makarov MV, Trammell SAJ, Migaud ME. The chemistry of the vitamin B3 metabolome. *Biochemical Society Transactions.* 2018; 47(1): 131-147.
12. Кучмеровська ТМ, Донченко ГВ, Тихоненко ТМ, Гузик ММ, Ставнійчук РВ, Яніцька ЛВ, Степаненко СП, Клименко АП. Вплив нікотинаміду на життєздатність острівцевих клітин підшлункової залози. *Укр. біохім. журн.* 2012;. 84(2): 81-88.

13. Кучмеровська ТМ. Нейротропна дія нікотинаміду та нікотиноїл- γ -аміномасляної кислоти у головному мозку при експериментальному паркінсонізмі щурів. Укр. біохім. журн. 1998; 70(6): 126-131.
14. Шиманський ІО, Донченко ГВ, Клименко АП, Кучмеровська ТМ. Механізми індукованих цукровим діабетом порушень процесу вивільнення серотоніну синапсосомами головного мозку щурів: ефект нікотинаміду. Укр. біохім. журн. 2006; 78(4): 130-138.
15. Yang Y, Sauve AA. NAD⁺ metabolism: Bioenergetics, signaling and manipulation for therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1864(12): 1787–1800.
16. Surjana D, Halliday GM, Damian DL. Role of Nicotinamide in DNA damage, mutagenesis, and DNA repair. *Journal of Nucleic Acids*. 2010; 157591.
17. Verdin E. NAD⁺ in aging, metabolism, and neurodegeneration. *Science*. 2015; 350 (6265): 1208-1213.
18. Rozanov AIa, Tishchenko DV, Zaporozhchenko AV. Metabolism and catabolism to CO₂ of [14C] gamma-aminobutyric acid conjugates with pyridoxal phosphate, nicotinate and biotin. *Ukr Biokhim Zh*. 1993; 65(4): 87-94.
19. Kopelevich VM, Gunar VI. Some approaches to the directed search for new drugs based on nicotinic acid. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 1999; 33 (4): 177–187.
20. Matsuyama K, Yamashita C, Noda A, Ichimaru Y, Gomita Y. Evaluation of isonicotinoyl-gamma-aminobutyric acid (GABA) and nicotinoyl-GABA as pro-drugs of GABA. *Chem Pharm Bull*. 1984; 32(10): 4089–95.
21. Avula B, Chittiboyina AG, Sagi S, Wang YH, Wang M, Khan IA³, Cohen PA. Identification and quantification of vinpocetine and picamilon in dietary supplements sold in the United States. *Drug Test Anal*. 2016; 8(3-4): 334-43.
22. Ершов ІН, Лучкина ЕВ, Покровский МВ, Покровская ТГ. Исследование эндотелио- и кардиопротективных эффектов ламотриджина, пикамилона и вальпроатов при экспериментальной эндотелиальной дисфункции. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2009; 3(108): 50-53.

23. Силкина ИВ, Ганьшина ТС, Середенин СБ, Мирзоян РС. ГАМК-ергический механизм цереброваскулярного и нейропротекторного эффектов афобазола и пикамилона. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2005; 68(1): 20-24.
24. Мирзоян РС. Нейропротекторные и цереброваскулярные эффекты ГАМК –миметиков. Эксперим. клин. Фармакология. 2003; 66, (2): 53-56.
25. Кучмеровская ТМ. Влияние никотинамида и никотиноил-ГАМК на захват и высвобождение серотонина и ГАМК синапсосомами головного мозга диабетических крыс. Нейрохимия. 1998; 15 (2): 159-164.
26. Kim YS, Yoon BE. Altered GABAergic Signaling in Brain Disease at Various Stages of Life. *Exp Neurobiol.* 2017; 26(3): 122–131.
27. Talebi N, Nematbakhsh M, Monajem R, Mazaheri S, Talebi A, Vafapour M. The Protective Effect of γ -aminobutyric Acid on Kidney Injury Induced by Renal Ischemia-reperfusion in Ovariectomized Estradiol-treated Rats. *Int J Prev Med.* 2016; 7: 6.
28. Powers M. GABA supplementation and growth hormone response. *Med Sport Sci.* 2012; 59: 36-46.
29. Soltani N, Qiu H, Aleksic M, Glinka Y, Zhao F, Liu R, Li Y, Zhang N, Chakrabarti R, Ng T, Jin T, Zhang H, Lu WY, Feng ZP, Prud'homme GJ, Wang Q. GABA exerts protective and regenerative effects on islet beta cells and reverses diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(28): 11692-7.
30. Brzozowska A, Burdan F, Duma D, Solski J, Mazurkiewi M. γ -amino butyric acid (GABA) level as an overall survival risk factor in breast cancer. *Ann Agric Environ Med.* 2017; 24(3): 435–439.
31. Ortega A. A new role for GABA: inhibition of tumor cell migration. *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24: 151–154.
32. Chen ZA, Bao MY, Xu YF, Zha RP, Shi HB, Chen TY, He XH. Suppression of Human Liver Cancer Cell Migration and Invasion via the GABAA Receptor. *Cancer Biol Med.* 2012; 9(2): 90-98.

33. Kelley JM, Hughes LB, Bridges SL, Jr. Does gamma-aminobutyric acid (GABA) influence the development of chronic. *J Neuroinflammation*. 2008; 5:1.
34. Xie M, Chen HH, Nie SP, Yin JY, Xie MY. Gamma-aminobutyric acid increases the production of short-chain fatty acids and decreases pH values in mouse colon. *Molecules*. 2017; 22(4). pii: E653.
35. Diana M, Quílez J, Rafecas M. Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: A review. *J. Funct. Foods*. 2014; 10: 407–420.
36. Auteri M, Zizzo MG, Serio R. GABA and GABA receptors in the gastrointestinal tract: from motility to inflammation. *Pharmacol Res*. 2015; 93: 11-21.
37. Шиманський ІО, Кучмеровська ТМ, Донченко ГВ, Великий ММ, Клименко АП, Паливода ОМ, Кучмеровський МО. Корекція нікотинамідом та нікотиноїл-ГАМК оксидативного стресу за діабетичної нейропатії. *Укр. біохім. журн*. 2002; 74(5): 89-95.
38. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2014; 383(9911): 69-82.
39. Ginter E, Simko V. Type 2 diabetes mellitus, pandemic in 21st century. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 771: 42-50.
40. Kharroubi AT, Darwish HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes*. 2015; 6(6): 850–867.
41. Maiese K. New Insights for Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Oxid Med Cell Longev*. 2015; 2015: 875961.
42. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi Pharm J*. 2016; 24(5): 547–553.
43. Adeshara KA, Diwan AG, Tupe RS. Diabetes and Complications: Cellular Signaling Pathways, Current Understanding and Targeted Therapies. *Curr Drug Targets*. 2016; 17(11): 1309-1328.
44. Ighodaro OM. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother*. 2018;108: 656-662

45. Park J, Lee J, Choi C. Mitochondrial network determines intracellular ROS dynamics and sensitivity to oxidative stress through switching inter-mitochondrial messengers. *PLoS One*. 2011; 6(8): e23211.
46. Tang X, Luo Y-X, Chen H-Z, Liu D-P). Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases. *Front. Physiol*. 2014; 5: 175.
47. Teodoro JS, Nunes S, Rolo AP, Reis F, Palmeira CM. Therapeutic Options Targeting Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction and Inflammation to Hinder the Progression of Vascular Complications of Diabetes. *Front Physiol*. 2018; 9: 1857.
48. Schoors S, Bruning U, Missiaen R, Queiroz K, Borgers G, Elia I, Zecchin A, Cantelmo AR, Christen S, Goveia J, Heggermont W, Goddé L, Vinckier S, Van Veldhoven P, Eelen G, Schoonjans L, Gerhardt H, Dewerchin M, Baes M, De Bock K, Ghesquière B., Lunt SY, Fendt SM, Carmeliet P. Fatty acid carbon is essential for dNTP synthesis in endothelial cells. *Nature*. 2015; 520(75-46): 192–197.
49. Santillo M, Colantuoni A, Mondola P, Guida B, Damiano S. NOX signaling in molecular cardiovascular mechanisms involved in the blood pressure homeostasis. *Front. Physiol*. 2015; 6: 194.
50. Li TB, Zhang JJ, Liu B, Liu WQ, Wu Y, Xiong XM, Luo XJ, Ma QL, Peng J. Involvement of NADPH oxidases and non-muscle myosin light chain in senescence of endothelial progenitor cells in hyperlipidemia. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol*. 2016. 389(3): 289–302.
51. Amanso AM, Griendling KK. Differential roles of NADPH oxidases in vascular physiology and pathophysiology. *Front. Biosci* 2012; 4: 1044–1064.;
52. Koziel R, Pircher H, Kratochwil M, Lener B, Hermann M, Dencher NA, Jansen-Dürr P. Mitochondrial respiratory chain complex I is inactivated by NADPH oxidase Nox4. *Biochem. J*. 2013; 452(2): 231–239.
53. Touyz RM, Montezano AC. Vascular Nox4: a multifarious NADPH oxidase. *Circ. Res*. 2012; 110(9): 1159–1161.

54. Paneni F, Mocharla P, Akhmedov A, Costantino S, Osto E, Volpe M, Lüscher TF, Cosentino F. Gene silencing of the mitochondrial adaptor p66Shc suppresses vascular hyperglycemic memory in diabetes. *Circ. Res.* 2012; 111(3): 278–289.
55. Aryangat AV, Gerich JE. Type 2 diabetes: postprandial hyperglycemia and increased cardiovascular risk. *Vascular Health and Risk Management.* 2010; 6: 145–155.
56. Fiorentino TV, Prioletta A, Zuo P, Folli F. Hyperglycemia-induced Oxidative Stress and its Role in Diabetes Mellitus Related Cardiovascular Diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 2013, 19: 5695-5703.
57. Francescato MP, Stel G, Geat M, Cauci S. Oxidative Stress in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus: is it affected by a single bout of prolonged exercise? *PLoS One.* 2014; 9(6): e99062.
58. Oates PJ. Polyol pathway and diabetic peripheral neuropathy. *Int Rev Neurobiol.* 2002; 50: 325-92.
59. Yan L. Redox imbalance stress in diabetes mellitus: Role of the polyol pathway. *Animal Model Exp Med.* 2018; 1(1): 7-13.
60. Gallagher EJ, LeRoith D, Stasinopoulos M, Zelenko Z, Shiloach J. Polyol accumulation in muscle and liver in a mouse model of type 2 diabetes. *J Diabetes Complications.* 2016;30(6): 999-1007.
61. Schemmel KE, Padiyara RS, D'Souza JJ. Aldose reductase inhibitors in the treatment of diabetic peripheral neuropathy. *J Diabetes Complications.* 2010; 24(5): 354-360.
62. Hashim Z, Zarina S. Osmotic stress induced oxidative damage: possible mechanism of cataract formation in diabetes. *J Diabetes Complications.* 2012; 26(4): 275-279.
63. Rhee SY, Kim YS. The Role of Advanced Glycation End Products in Diabetic Vascular Complications. *Diabetes Metab J.* 2018 Jun; 42(3): 188–195.
64. Golbidi S, Badran M, Laher I. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Exercise in Diabetic Patients. *Exp Diabetes Res.* 2012; 2012: 941868.

65. Shih RH, Wang CY, Yang CM. NF-kappa B Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review. *Front Mol Neurosci.* 2015; 8:77.
66. Santilli F, D'Ardes D, Davì G. Oxidative stress in chronic vascular disease: from prediction to prevention. *Vascul. Pharmacol.* 2015; 74: 23–37.
67. Kolluru GK, Bir SC., Kevil CG. Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. *International Journal of Vascular Medicine.* 2012; 2012: 918267.
68. Geraldès P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms & its impact on diabetic complications. *Circ Res.* 2010; 106(8): 1319–1331.
69. Funk SD, Yurdagul A, Jr Orr AW. Hyperglycemia and Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis: Lessons from Type 1 Diabetes. *Int J Vasc Med.* 2012; 2012: 569654
70. Yahagi K, Kolodgie FD, Lutter C, Mori H, Romero ME, Finn AV, Virmani R. ATVB in Focus series on "Vascular Calcification in Diabetes" Pathology of Human Coronary and Carotid Artery Atherosclerosis and Vascular Calcification in Diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017; 37(2): 191–204.
71. Quaegebeur A, Lange C, Carmeliet P. The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neuron.* 2011; 71(3): 406–424.
72. Ortuzar N, Rico-Barrio I, Bengoetxea H, Argandoña EG Lafuente JV. VEGF reverts the cognitive impairment induced by a focal traumatic brain injury during the development of rats raised under environmental enrichment. *Behavioural Brain Research.* 2013; 246: 36-46.
73. Nelson AR, Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Neurovascular Dysfunction and Neurodegeneration in Dementia and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2016; 1862(5): 887–900.
74. Rosenstein JM, Krum JM, Ruhrberg C. VEGF in the nervous system. *Organogenesis.* 2010; 6(2): 107–114.

75. Förstermann U, Sessa WS. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012; 33(7): 829–837.
76. Zhou L, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide.* 2009; 20: 223–230.
77. Triggle CR, Samuel SM, Ravishankar S, Marei I, Arunachalam G, Ding H. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2012. 90(6): 713–738.
78. Jafari Anarkooli I, Sankian M, Ahmadpour S, Varasteh AR, Haghiri H. Evaluation of Bcl-2 family gene expression and Caspase-3 activity in hippocampus STZ-induced diabetic rats. *Exp Diabetes Res.* 2008; 2008: 638467.
79. Zhou S, Chen HZ, Wan YZ, Zhang QJ, Wei YS, Huang S, Liu JJ, Lu YB, Zhang ZQ, Yang RF, Zhang R, Cai H, Liu DP, Liang CC. Repression of P66Shc Expression by SIRT1 contributes to the prevention of hyperglycemia-induced endothelial dysfunction. *Circ. Res.* 2011; 109(6): 639–648.
80. Sidoryk-Wegrzynowicz M, Wegrzynowicz M, Lee E, Bowman AB, Aschner M. Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicol Pathol.* 2011;39(1): 115-123.
81. Li W, Roy Choudhury G, Winters A, Prah J, Lin W, Liu R, Yang SH. Hyperglycemia Alters Astrocyte Metabolism and Inhibits Astrocyte Proliferation. *Aging Dis.* 2018; 9(4): 674–684.
82. Siracusa R, Fusco R, Cuzzocrea S. Astrocytes: Role and Functions in Brain Pathologies. *Front Pharmacol.* 2019; 10: 1114.
83. Hol EM, Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol.* 2015; 32: 121-30.
84. Guzyk MM, Tykhomyrov AA, Nedzvetsky VS, Prischepa IV, Grinenko TV, Yanitska LS, Kuchmerovska TM. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors reduce reactive gliosis and improve angiostatin levels in retina of diabetic rats. *Neurochemical research.* 2016; 41 (10): 2526-2537.

85. Martin CL, Albers JW, Pop-Busui R. Neuropathy and related findings in the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study. *Diabetes Care*. 2014; 37: 31–38.
86. Mayer CA, Brunkhorst R, Niessner M, Pfeilschifter W, Steinmetz H, Foerch C. Blood levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in patients with neurological diseases. *PLoS One*. 2013; 8(4): e62101.]
87. Yuan A, Rao MV, Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017; 9(4). pii: a018309.
88. Qiao X, Zhang S, Zhao W, Ye H, Yang Y, Zhang Z, Miao Q, Hu R, Li Y, Lu B. Serum Phosphorylated Neurofilament-Heavy Chain, a Potential Biomarker, is Associated With Peripheral Neuropathy in Patients With Type 2 Diabetes. *Medicine (Baltimore)*. 2015; 94(44): e1908.
89. Cermenati G, Giatti S, Audano M, Pesaresi M, Spezzano R, Caruso D, Mitro N, Melcangi RC. Diabetes alters myelin lipid profile in rat cerebral cortex: Protective effects of dihydroprogesterone.. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2017; 168: 60-70.
90. Korley FK, Goldstick J, Mastali M, Van Eyk JE, Barsan W, Meurer WJ, Sussman J, Falk H, Levine D. Serum NfL (Neurofilament Light Chain) Levels and Incident Stroke in Adults With Diabetes Mellitus. *Stroke*. 2019;50(7): 1669-1675.
91. Fricker RA, Green EL, Jenkins SI, Griffin SM. The Influence of Nicotinamide on Health and Disease in the Central Nervous System. *Int J Tryptophan Res*. 2018; 11: 1178646918776658.
92. Anderson KA, Madsen AS, Olsen CA, Hirschey MD. Metabolic control by sirtuins and other enzymes that sense NAD⁺, NADH, or their ratio. *Biochim Biophys Acta*. 2017; 1858(12): 991–998.
93. Madison DL, Lundblad JR. C-terminal Binding Protein (CtBP) and Poly(ADP)ribose polymerase1 (PARP-1) contribute to repression of the p21^{waf1/cip1} promoter. *Oncogene*. 2010; 29(45): 6027–6039.

94. Jing H, Lin H. Sirtuins in Epigenetic Regulation. *Chem Rev.* 2015; 115(6): 2350–2375.
95. Guarente L, Franklin H. Epstein Lecture: Sirtuins, aging, and medicine. *N Engl J Med.* 2011; 364: 2235–2244.
96. Nogueiras R, Habegger KM, Chaudhary N, Finan B, Banks AS, Dietrich MO, Horvath TL, Sinclair DA, Pfluger PT, Tschöp MH. Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. *Physiol Rev.* 2012; 92: 1479–1514.
97. Kitada M, Kume S, Takeda-Watanabe A, Kanasaki K, Koya D. Sirtuins and renal diseases: relationship with aging and diabetic nephropathy. *Clin Sci (Lond).* 2013; 124: 153–164.
98. Walker AK, Yang F, Jiang K, Ji JY, Watts JL, Purushotham A, Boss O, Hirsch ML, Ribich S, Smith JJ, et al. Conserved role of SIRT1 orthologs in fasting-dependent inhibition of the lipid/cholesterol regulator SREBP. *Genes Dev.* 2010; 24: 1403–1417.
99. Turkmen K, Karagoz A, Kucuk A. Sirtuins as novel players in the pathogenesis of diabetes mellitus. *World J Diabetes.* 2014; 5(6): 894–900.
100. Sack MN, Finkel T. Mitochondrial metabolism, sirtuins, and aging. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012; 4(12): pii: a013102.
101. Srivastava S. Emerging therapeutic roles for NAD⁺ metabolism in mitochondrial and age-related disorders. *Clin Transl Med.* 2016; 5: 25.
102. Liu C, Yu X. ADP-Ribosyltransferases and Poly ADP-Ribosylation. *Curr Protein Pept Sci.* 2015; 16(6): 491–501.
103. Дрель ВР, Шиманський ІО, Сибірна НО, Великий ММ. Роль PARP та процесу полі-ADP-рибозилування протеїнів у регулюванні клітинних функцій. *Укр. біохім. Журн.* 2011; 83, 6: 5-34.
104. Morales J, Li L, Fattah FJ, Dong Y, Bey EA, Patel M, Gao J, Boothman DA. Review of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Mechanisms of Action and Rationale for Targeting in Cancer and Other Diseases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2014; 24(1): 15–28.

105. Krishnakumar R, Kraus WL. The parp side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Molecular cell*. 2010; 39 (1): 8–24.
106. Cohen MS, Chang P. Insights into the biogenesis, function, and regulation of ADP-ribosylation. *Nature Chemical Biology*. 2018; 14 (3): 236–243.
107. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986).
108. Chattopadhyay S, Ramanathan M, Das J, Bhattacharya S. Animal models in experimental diabetes mellitus. *Indian Journal of Experimental Biology*. 1997; 35(11): 1141–1145.
109. Abita JP, Parniak M, Kaufman S. *Methods in Enzymology*. Academic Press, Orlando. 1987; 27.
110. Kassák P, Przygodzki T, Habodászová D, Bryszewska M, Sikurová L. Mitochondrial alterations induced by 532 nm laser irradiation. *Gen. Physiol. Biophys.* 2005; 24(2): 209-222.
111. Swann JD, 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.
112. Coder DM. Assessment of cell viability. *Current protocols in cytometry*. 2001; 9: Unit 9.2
113. Crowley LC, Christensen ME, Waterhouse NJ. Measuring Mitochondrial Transmembrane Potential by TMRE Staining Cold Spring Harb Protoc. 2016; 12.
114. Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science*. 1995; 4(11): 2411–2423.
115. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(1): 265-275.

116. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680–685.
117. Andres MM, Luszczki JJ. 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.
118. Bergmeyer H. *Methods of Enzymatic Analysis*. New York, London: Verlag Chemie. 1963; 2300 p.
119. Luna L.G. *Manual of Histologic Staining Methods of the AFIP*, 3rd edition, McGraw-Hill. 1968, p.76.
120. Geuna S, Gigo-Benato D, Rodrigues Ade C. On sampling and sampling errors in histomorphometry of peripheral nerve fibers. *Microsurgery*. 2004; 24(1): 72-76.
121. Goyal R , Mathur SK , Gupta S , Goyal R , Kumar S , Batra A , Hasija S , Sen R. Immunohistochemical expression of glial fibrillary acidic protein and CAM5.2 in glial tumors and their role in differentiating glial tumors from metastatic tumors of central nervous system . *J Neurosci Rural Pract*. 2015. 6: 499 – 503.
122. Ohno M. Abe T. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (lif) and interleukin-6 (il-6). *Journal of Immunological Methods*. 1991; 145(1-2): 199–203.
123. Drabarek B, Dymkowska D, Szczepanowska J, Zabłocki K. TNF α affects energy metabolism and stimulates biogenesis of mitochondria in EA.hy926 endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(9): 1390-1397.
124. Purwana I, Zheng J, Li X, Deurloo M, Son DO, Zhang Z, Liang C, Shen E, Tadkase A, Feng ZP, Li Y, Hasilo C, Paraskevas S, Bortell R, Greiner DL, Atkinson M, Prud'homme GJ, Wang Q. GABA promotes human β -cell proliferation and modulates glucose homeostasis. *Diabetes*. 2014;63(12): 4197–4205.

125. Soltani N, Qiu H, Aleksic M, Glinka Y, Zhao F, Liu R, Li Y, Zhang N, Chakrabarti R, Ng T, Jin T, Zhang H, Lu WY, Feng ZP, Prud'homme GJ, Wang Q. GABA exerts protective and regenerative effects on islet beta cells and reverses diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(28): 11692–11697.
126. Tian J, Dang H, Chen Z, Guan A, Jin Y, Atkinson MA, Kaufman DL. γ -Aminobutyric acid regulates both the survival and replication of human β -cells. *Diabetes*. 2013;62(11): 3760–3765.
127. Korol SV, Jin Z, Jin Y, Bhandage AK, Tengholm A, Gandasi NR, Barg S, Espes D, Carlsson PO, Laver D, Birnir B. Functional characterization of native, high-affinity GABA_A receptors in human pancreatic beta cells. *EBioMedicine*. 2018; 30: 273-282.
128. Al-Hasani K, Pfeifer A, Courtney M, Ben-Othman N, Gjernes E, Vieira A, Druelle N, Avolio F, Ravassard P, Leuckx G, Lacas-Gervais S, Ambrosetti D, Benizri E, Hecksher-Sorensen J, Gounon P, Ferrer J, Gradwohl G, Heimberg H, Mansouri A, Collombat P. Adult duct-lining cells can reprogram into β -like cells able to counter repeated cycles of toxin-induced diabetes. *Dev. Cell*. 2013; 26: 86-100.
129. Courtney M, Gjernes E, Druelle N, Ravaud C, Vieira A, Ben-Othman N, Pfeifer A, Avolio F, Leuckx G, Lacas-Gervais S, Burel-Vandenbos F, Ambrosetti D, Hecksher-Sorensen J, Ravassard P, Heimberg H, Mansouri A, Collombat P. The inactivation of Arx in pancreatic α -cells triggers their neogenesis and conversion into functional β -like cells. *PLoS Genet*. 2013; 9: e1003934.
130. Ben-Othman N, Vieira A, Courtney M, Record F, Gjernes E, Avolio F, Hadzic B, Druelle N, Napolitano T, Navarro-Sanz S, Silvano S, Al-Hasani K, Pfeifer A, Lacas-Gervais S, Leuckx G, Marroquí L, Thévenet J, Madsen OD, Eizirik DL, Heimberg H, Kerr-Conte J, Pattou F, Mansouri A, Collombat P. Administration Induces Alpha Cell-Mediated Beta-like Cell. 2017; 168(1-2): 73–78.

131. Kaul K, Apostolopoulou M, Roden M. Insulin resistance in type 1 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2015; 64 (12): 1629-1639.
132. Mah E, Bruno RS. Postprandial hyperglycemia on vascular endothelial function: mechanisms and consequences. *Nutr Res*. 2012; 32(10): 727-40.
133. Lee YS, Morinaga H, Kim JJ, Lagakos W, Taylor S, Keshwani M, Perkins G, Dong H, Kayali AG, Sweet IR, Olefsky J. The fractalkine/CX3CR1 system regulates beta cell function and insulin secretion. *Cell*. 2013; 153: 413–425.
134. Jonas JC, Sharma A, Hasenkamp W, Ilkova H, Patanè G, Laybutt R, Bonner-Weir S, Weir GC. Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes. *J Biol Chem*. 1999; 274: 14112–14121.
135. Sharma RB, Alonso LC. Lipotoxicity in the pancreatic beta cell: not just survival and function, but proliferation as well? *Curr Diab Rep*. 2014;14(6): 492.
136. Kai AK, Lam AK, Chen Y, Tai AC, Zhang X, Lai AK, Yeung PK, Tam S, Wang J, Lam KS, Vanhoutte PM, Bos JL, Chung SS, Xu A, Chung SK. Exchange protein activated by cAMP 1 (Epac1)-deficient mice develop β -cell dysfunction and metabolic syndrome. *FASEB J*. 2013; 10: 4122-35.
137. Eleazu CO, Eleazu KC, Chukwuma S, Essien UN. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *J Diabetes Metab Disord*. 2013; 12: 60.
138. Radenković M, Stojanović M, & Prostran M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2016; 78: 13–31.
139. Rowe PA, Campbell-Thompson ML, Schatz DA, Atkinson MA. The pancreas in human type 1 diabetes. *Semin Immunopathol*. 2011; 33(1): 29–43.
140. Bian C, Zhang C, Luo T, Vyas A, Chen SH, Liu C, Kassab MA, Yang Y, Kong M, Yu X. NADP⁺ is an endogenous PARP inhibitor in DNA damage response and tumor suppression. *Nature Communications*. 2019; 10(1): 693.

141. Akbari M, Hassan-Zadeh V. Hyperglycemia affects the expression of inflammatory genes in peripheral blood mononuclear cells of patients with type 2 diabetes. *A Journal of Molecular and Cellular Immunology*. 2018; 47(7): 654-665.
142. 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.
143. Wang Q, Zhang M, Torres G, Wu S, Ouyang C, Xie Z, Zou MH. Metformin suppresses diabetes-accelerated atherosclerosis via the inhibition of Drp1-mediated mitochondrial fission. *Diabetes*. 2017; 66(1): 193-205.
144. Fang H, Hu N, Zhao Q, Wang B, Zhou H, Fu Q, Shen L, Chen X, Shen F, Lyu J. mtDNA haplogroup N9a increases the risk of T2DM by altering mitochondrial function and intracellular mitochondrial signals. *Diabetes*. 2018; 67(7): 1441-1453.
145. Bhandage AK, Jin Z, Korol SV, Shen Q, Pei Y, Deng Q, Espes D, Carlsson PO, Kamali-Moghaddam M, Birnir B. GABA Regulates Release of Inflammatory Cytokines From Peripheral Blood Mononuclear Cells and CD4⁺ T Cells and Is Immunosuppressive in Type 1 Diabetes. *EBioMedicine*. 2018;30: 283-294.
146. Rains JL, Jain SK: Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med*. 2011; 50: 567-575.
147. Hsu HC, Chiou JF, Wang YH, Chen CH, Mau SY, Ho CT, Chang PJ, Liu TZ and Chen CH: Folate deficiency triggers an oxidative-nitrosative stress-mediated apoptotic cell death and impedes insulin biosynthesis in RINm5F pancreatic islet β -cells: Relevant to the pathogenesis of diabetes. *PLoS One*. 2013; 8: e77931.
148. Houtkooper RH, Cantó C, Wanders RJ, Auwerx J. “The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocrinol Rev*. 2010; 2: 194-223.

149. Morales J, Li L, Fattah FJ, Dong Y, Bey EA, Patel M, Gao J, Boothman DA. Review of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2014; 24(1): 15–28.
150. Гузик ММ, Дякун КО, Тихоненко ТМ, Яніцька ЛВ, Кучмеровська ТМ. Вплив інгібіторів полі ADP-рибopolімерази-1 (PARP-1) на клітини підшлункової залози лінії RINm5f. Матеріали IV Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю “Хімія природних сполук”, Тернопіль, 21-22 квітня, 2016. С. 75-76.
151. Guzyk MM, Tykhonenko TM, Donchenko GV, Kuchmerovska TM. PARP-1 Inhibition under oxidative stress in pancreatic islet cells. Joint meeting of the islet study group & beta cell workshop, May 3-7, 2015, Jerusalem, Israel, Program & Abstracts. - PA-49. – 2015; P. 147.
152. Fouquerel E, Sobol RW. ARTD1 (PARP1) activation and NAD(+) in DNA repair and cell death. *DNA Repair (Amst).* 2014 Nov;23: 27-32.
153. Тихоненко ТМ, Донченко ГВ, Клименко АП, Кучмеровська ТМ. Цитотоксична дія стрептозотоцину на бета-клітини підшлункової залози щурів: ефект N-метилнікотинаміду. Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології (Десяті Данилевські читання). 2011 (Харків). С. 128-129.
154. Dan Dunn J, Alvarez LA, Zhang X, Soldati T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol.* 2015; 6: 472–485.
155. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 2016; 1863(12): 2977-2992.
156. Mehmeti I, Gurgul-Convey E, Lenzen S, Lortz S. Induction of the intrinsic apoptosis pathway in insulin-secreting cells is dependent on oxidative damage of mitochondria but independent of caspase-12 activation. 2011; 1813(10): 1827–1835.

157. Guzyk MM, Dyakun KO, Yanytska LV, Pryvrotska IB, Pishel' IM, Kuchmerovska TM. Inhibitors of Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1 as Agents Providing Correction of Brain Dysfunctions Induced by Experimental Diabetes. *Neurophysiology*. 2017; 49(3): 183-193.
158. Dymkowska D, Drabarek B, Podszywałow-Bartnicka P, Szczepanowska J, Zabłocki K. Hyperglycaemia modifies energy metabolism and reactive oxygen species formation in endothelial cells in vitro. *Arch Biochem Biophys*. 2014; 542: 7-13.
159. Yokoyama M, Shimizu I, Nagasawa A, Yoshida Y, Katsuumi G, Wakasugi T, Hayashi Y, Ikegami R, Suda M, Ota Y, Okada S, Fruttiger M, Kobayashi Y, Tsuchida M, Kubota Y, Minamino T. p53 plays a crucial role in endothelial dysfunction associated with hyperglycemia and ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. 2019; 129: 105-117.
160. Shen GX. Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2010; 88(9): 241-248.
161. Katakami N. Mechanism of Development of Atherosclerosis and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. *J Atheroscler Thromb*. 2018; 25(1): 27–39.
162. Al Ghouleh I, Khoo NK, Knas UG, Griendling KK, Touyz RM, Thannickal VJ, Barchowsky A, Nauseef WM, Kelley EE, Bauer PM, Darley-Usmar V, Shiva S, Cifuentes-Pagano E, Freeman BA, Gladwin MT, Pagano PJ. Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease: new concepts in reactive oxygen species signaling. *Free Radic Biol Med*. 2011; 51(7): 1271-1288.
163. Zhao H, Ma T, Fan B, Yang L, Han C, Luo J and Kong L: Protective effect of trans- δ -viniferin against high glucose-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells through the SIRT1 pathway. *Free Radic Res*. 2016; 50: 68–83.

164. Guzyk MM, Tykhonenko TM, Dyakun KO, Yanitska LV, Pryvrotska IB, Kuchmerovska TM. Altered sirtuins 1 and 2 expression in the brain of rats induced by experimental diabetes and the ways of its correction. *Ukr.Biochem.J.* 2019; 91(1): 21-29.
165. Giedt RJ, Pfeiffer DR, Matzavinos A, Kao CY, Alevriadou BR. Mitochondrial Dynamics and Motility Inside Living Vascular Endothelial Cells: Role of Bioenergetics. *Ann. Biomed. Eng.* 2012; 40: 1903–1916.
166. Jang SY, Kang HT, Hwang ES. Nicotinamide-induced mitophagy: event mediated by high NAD⁺/NADH ratio and SIRT1 protein activation. *J Biol Chem.* 2012; 287(23): 19304-19314.
167. Dengjel J, Abeliovich H. Roles of mitophagy in cellular physiology and development. *Cell Tissue Res.* 2017; 367(1): 95-109.
168. Huang JY, Hirschey MD, Shimazu T, Ho L, Verdin E. Mitochondrial sirtuins. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1804(8): 1645-1651.
169. Olmos Y, Sánchez-Gómez FJ, Wild B, García-Quintans N, Cabezudo S, Lamas S, Monsalve M. SirT1 regulation of antioxidant genes is dependent on the formation of a FoxO3a/PGC-1 α complex. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 19(13): 1507-21.
170. Song SB, Jang SY, Kang HT, Wei B, Jeoun UW, Yoon GS², Hwang ES. . Modulation of Mitochondrial Membrane Potential and ROS Generation by Nicotinamide in a Manner Independent of SIRT1 and Mitophagy. *Mol Cells.* 2017; 40(7): 503-514.
171. Wang S, Wang J, Zhao A, Li J. SIRT1 activation inhibits hyperglycemia-induced apoptosis by reducing oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human endothelial cells. *Molecular Medicine Reports Retweeted.* 2017; 16(3): 3331-3338.
172. Singh R, Kishore L, Kaur N. Diabetic peripheral neuropathy: current perspective and future directions. *Pharmacol Res.* 2014 Feb; 80():21-35., Callaghan B, Feldman E. The metabolic syndrome and neuropathy: therapeutic challenges and opportunities. *Ann Neurol.* 2013 Sep; 74(3): 397-403.

173. 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.
174. Lirk P, Verhamme C, Boeckh R, Stevens MF, ten Hoope W, Gerner P, Blumenthal S, de Girolami U, van Schaik IN, Hollmann MW, Picardi S. Effects of early and late diabetic neuropathy on sciatic nerve block duration and neurotoxicity in Zucker diabetic fatty rats. *Br J Anaesth*. 2015;114(2): 319-26.
175. Kuchmerovska TM, Tykhonenko TM, Tykhomyrov AO, Guzyk MM. 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), P. 202-203.
176. Coleman MP, Freeman MR. Wallerian Degeneration, Wld^s, and Nmnat. *Annu Rev Neurosci*. 2010; 33: 245–267.
177. Гузик ММ, Сергійчук ЮТ, Тихоненко ТМ, Яніцька ЛВ, Кучмеровська ТМ. Амінокислотний склад колагену І типу кісток за експериментального цукрового діабету: ефект нікотинаміду. *Ендокринологія*. 2014; 19(4): 289.
178. Dong M, Ren M, Li C, Zhang X, Yang C, Zhao L, Gao H. Analysis of Metabolic Alterations Related to Pathogenic Process of Diabetic Encephalopathy Rats. *Front Cell Neurosci*. 2019; 12: 527.
179. Mozos I, Luca CT Crosstalk between Oxidative and Nitrosative Stress and Arterial Stiffness. *Curr Vasc Pharmacol*. 2017;15(5): 446-456.
180. Yan LJ. Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress. *J Diabetes Res*. 2014; 2014: 137919.
181. Tappy L, Mittendorfer B. Fructose toxicity: is the science ready for public health actions? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2012; 15(4): 357-61.
182. Kuchmerovskaya TM, Donchenko GV, Klimenko AP, Yefimov AS. The role of aldose reductase inhibitors in the development of peripheral neuropathies in experimental diabetes. *Ukr. biokhim. zhurn*. 1997; 70(3): 77-82.

183. Kuchmerovska T, Shymanskyi I, Donchenko G, Kuchmerovskyy M, Pakirbaieva L, Klimenko A. Poly(ADP-ribosyl)ation enhancement in brain cells nuclei is associated with diabetic neuropathy. *J Diabetes Complications*. 2004; 18(4): 198-204.
184. Sun TH, Heimark DB, Nguyen T, Nadler JL, Larner J. Both myo-inositol to chiro-inositol epimerase activities and chiro-inositol to myo-inositol ratios are decreased in tissues of GK type 2 diabetic rats compared to Wistar controls. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 293: 1092-98.
185. Vinik AI, Park TS, Stansberry KB, Pittenger GL. Diabetic neuropathies. *Diabetologia*. 2000; 43(8): 957-73.
186. Gonzalez-Salgado A, Steinmann ME, Greganova E, Rauch M, Mäser P, Sigel E, et al. Myo-Inositol uptake is essential for bulk inositol phospholipid but not glycosyl phosphatidylinositol synthesis in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*. 2012; 287(16): 13313-23.
187. Feldman EL, Nave KA, Jensen TS, Bennett DL. New Horizons in diabetic neuropathy: Mechanisms, bioenergetics, and pain. *Neuron*. 2017; 93(6): 1296-1313.
188. Тихоненко ТМ, Дякун КО, Яніцька ЛВ, Кучмеровська ТМ. Нейропротекторний вплив сумісної дії нікотинаміду, α - ліпоєвої кислоти та І-ацетил карнітину за експериментального цукрового діабету. Матеріали Третьої міжнародної конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”, 24-25 вересня, 2015 Дніпропетровськ. С. 83-84.
189. Яніцька ЛВ, Тихоненко ТМ, Гузик ММ, Кучмеровська ТМ. Участь поліолового шляху в розвитку дисфункцій мозку, індукованих експериментальним діабетом: ефект нікотинаміду. *Ендокринологія*. 2017; 22(3): 279-283.
190. Cai D, Liu T. Inflammatory cause of metabolic syndrome via brain stress and NF- κ B. *Aging*. 2012; 4(2): 98–115.

191. Li H, Horke S, Förstermann U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2013; 34(6): 313–319.
192. Alvarez-Nölting R, Arnal E, Barcia JM, Miranda M, Romero FJ. Protection by DHA of early hippocampal changes in diabetes: possible role of CREB and NF- κ B. *Neurochemical Research*. 2012 Jan; 37(1): 105-115.
193. Тихоненко ТМ, Тихомиров АО, Гузик ММ, Дякун КО, Кучмеровська ТМ. 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), С. 242.
194. Alam SI, Rehman SU, Kim MO. Nicotinamide Improves Functional Recovery via Regulation of the RAGE/JNK/NF- κ B Signaling Pathway after Brain Injury. *J Clin Med*. 2019; 8(2). pii: E271.
195. Gao W, Ferguson G, Connell P, et al. High glucose concentrations alter hypoxia-induced control of vascular smooth muscle cell growth via a HIF-1 alpha-dependent pathway. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42: 609-619.
196. Сергійчук ЮТ, Тихоненко ТМ, Гузик ММ, Яніцька ЛВ, Кучмеровська ТМ. Вплив сумісної дії нікотинаміду, ацетил- l -карнітину та α -ліпоєвої кислоти на окремі ланки обміну вуглеводів за експериментального діабету 2 типу. *Біологічні студії*. 2014; 8(3-4): 41-52.
197. Hasnan J, Yusof MI, Damitri TD, Faridah AR, Adenan AS, Norbaini TH. Relationship between apoptotic markers (Bax and Bcl-2) and biochemical markers in type 2 diabetes mellitus. *Singapore Med J*. 2010; 51(1): 50-55.
198. Turunc Bayrakdar E, Uyanikgil Y, Kanit L, Koylu E, Yalcin A. Nicotinamide treatment reduces the levels of oxidative stress, apoptosis, and PARP-1 activity in A β (1-42)-induced rat model of Alzheimer's disease. *Free Radic Res*. 2014; 48(2): 146-58.

199. Сергійчук ЮТ, Тихоненко ТМ, Кучмеровська ТМ. Сумісний вплив нікотинаміду, ацетил-L-карнітину та α -ліпоєвої кислоти на дисфункцію мозку щурів за цукрового діабету 2-го типу. *The Ukrainian biochemical journal XI Український біхімічний конгрес.* 2014, 86, 5(supplement 1) p.205.
200. Arrick DM, Sharpe GM, Sun H, Mayhan WG.. nNOS-Dependent Reactivity of Cerebral Arterioles in Type 1 Diabetes *Brain Res.* 2007; 1184: 365–371.
201. Carla S. Jung,* Christian Wispel, Klaus Zweckberger, Christopher Beynon, Daniel Hertle, Oliver W. Sakowitz, and Andreas W. Unterberg. Endogenous Nitric-Oxide Synthase Inhibitor ADMA after Acute Brain Injury. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(3): 4088–4103.
202. Rosenstein JM, Krum JM and Ruhrberg C. VEGF in the nervous system. *Organogenesis.* 2010; 6(2): 107–114.
203. Tykhonenko ТМ, Tykhomyrov АО, Guzyk ММ, Dyakun КО, Kuchmerovska ТМ. The effects of nicotinamide on the brain functional protein markers in prevention of diabetic neuropathy. *Materials of 32nd ECNP (European College of Neuropsychopharmacology) Congress.* Published in in supplement to the journal *European Neuropsychopharmacology (Copenhagen, 7-10 September, 2019).* Denmark, 2019, T. 29, supplement 6, P. s554-s555.
204. Provia J, Jeynes B. Reduction in vascular endothelial growth factor expression in the superior temporal, hippocampal, and brainstem regions in Alzheimer's disease. *Curr Neurovasc Res.* 2014; 11(3): 202-209.
205. Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, Theilmeier G, Dewerchin M, Laudénbach V, Vermeylen P, Raat H, Acker T, Vleminckx V, Van Den Bosch L, Cashman N, Fujisawa H, Drost MR, Sciot R, Bruyninckx F, Hicklin DJ, Ince C, Gressens P, Lupu F, Plate KH, Robberecht W, Herbert JM, Collen D, Carmeliet P. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat. Genet.* 2001; 28: 131–138.

206. Pronto-Laborinho AC, Pinto S, de Carvalho M. Roles of Vascular Endothelial Growth Factor in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *BioMed Research International*. Volume. 2014; 2014: 947513.
207. Zhang Z, Zoltewicz JS, Mondello S, Newsom KJ, Yang Z, Yang B, Kobeissy F, Guingab J, Glushakova O, Robicsek S, Heaton S, Buki A, Hannay J, Gold MS, Rubenstein R, Lu XC, Dave JR, Schmid K, Tortella F, Robertson CS, Wang KK. Human traumatic brain injury induces autoantibody response against glial fibrillary acidic protein and its breakdown products. *PLoS One*. 2014; 9(3): e92698.
208. Lopategui Cabezas I, Herrera Batista A, Pentón Rol G. The role of glial cells in Alzheimer's disease: Potential therapeutic implications. *Neurologia*. 2014; 29: 305–330.
209. Członkowska A, Kurkowska-Jastrzębska I. Inflammation and gliosis in neurological diseases--clinical implications. *Journal of Neuroimmunology*. 2011; 231: 78–85.
210. Liu B, Teschemacher AG, Kasparov S. Astroglia as a cellular target for neuroprotection and treatment of neuro-psychiatric disorders. *Glia*. 2017; 65(8): 1205–1226.
211. Guzyk MM, Tykhomyrov AA, Nedzvetsky VS, Prischepa IV, Grinenko TV, Yanitska LV, Kuchmerovska TM. Poly(ADP-Ribose)polymerase-1 (PARP-1) inhibitors reduce reactive gliosis and improve angiostatin levels in retina of diabetic rats. *Neurochem Res*. 2016; 41(10): 2526-2537.
212. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010; 119: 7-35.
213. Yuan A, Rao MV, Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments and neurofilament proteins in health and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 2017; 9(4): pii: a018309.
214. Scott JN, Clark AW, Zochodne DW. Neurofilament and tubulin gene expression in progressive experimental diabetes: failure of synthesis and export by sensory neurons. *Brain* 1999; 122: 2109–18.

215. Kuchmerovska TM, Tykhonenko TM, Guzyk MM, Tykhomyrov AO, Yanitska LV. Nicotinamide and Nicotinoyl-Gaba in Prevention of Experimental Diabetic Neuropathy. *Jacobs journal of diabetes and endocrinology*. 2018; 4(1).
216. Nam SM, Kwon HJ, Kim W, Kim JW, Hahn KR, Jung HY, Kim DW, Yoo DY, Seong JK, Hwang IK, Yoon YS. Changes of myelin basic protein in the hippocampus of an animal model of type 2 diabetes. *Lab Anim Res*. 2018; 34(4): 176-184.
217. Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology*. 2011; 93(3): 421–443.
218. Foerch C, Niessner M, Back T, Bauerle M, De Marchis GM, Ferbert A, Grehl H, Hamann GF, Jacobs A, Kastrup A, Klimpe S, Palm F, Thomalla G, Worthmann H, Sitzer M; BE FAST Study Group. Diagnostic accuracy of plasma glial fibrillary acidic protein for differentiating intracerebral hemorrhage and cerebral ischemia in patients with symptoms of acute stroke. *Clin Chem*. 2012; 58(1): 237–245.
219. Su W, Chen HB, Li SH, Wu DY. Correlational study of the serum levels of the glial fibrillary acidic protein and neurofilament proteins in Parkinson's disease patients. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2012; 114(4): 372–375.
220. Disanto G, Barro C, Benkert P, Naegelin Y, Schädelin S, Giardiello A, Zecca C, Blennow K, Zetterberg H, Leppert D, Kappos L, Gobbi C, Kuhle J; Swiss Multiple Sclerosis Cohort Study Group. Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2017; 81(6): 857-870.
221. Byrne LM, Rodrigues FB, Blennow K, Durr A, Leavitt BR, Roos RAC, Scahill RI, Tabrizi SJ, Zetterberg H, Langbehn D, Wild EJ. Neurofilament light protein in blood as a potential biomarker of neurodegeneration in Huntington's disease: a retrospective cohort analysis. *Lancet Neurol*. 2017; 16(8):601-609.
222. Verdin E, Hirschey MD, Finley LW, Haigis MC. Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling. *Trends Biochem Sci*. 2010; 35(12): 669-675.

223. Chen J, Zhou Y, Mueller-Steiner S, Chen LF, Kwon H, Yi S, Mucke L, Gan L. SIRT1 protects against microglia-dependent amyloidbeta toxicity through inhibiting NF-kappa B signaling. *J Biol chem.* 2005; 280(48): 40364-40374.
224. Satoh A, Brace CS, Ben-Josef G, West T, Wozniak DF, Holtzman DM, Herzog ED, Imai S. SIRT1 promotes the central adaptive response to diet restriction through activation of the dorsomedial and lateral nuclei of the hypothalamus. *J Neurosci.* 2010; 30(30): 10220-10232.
225. Jeon SM. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *exp Mol Med.* 2016; 48(7): e245.
226. Yuan F, Xu ZM, Lu LY, Nie H, Ding J, Ying WH, Tian HL. SIRT2 inhibition exacerbates neuroinflammation and blood-brain barrier disruption in experimental traumatic brain injury by enhancing NF- κ B p65 acetylation and activation. *J Neurochem.* 2016; 136(3): 581-593.
227. Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys res commun.* 2000; 273(2): 793-798.
228. Dryden SC, Nahhas FA, Nowak JE, Goustin AS, Tainsky MA. Role for human SIRT2 NADdependent deacetylase activity in control of mitotic exit in the cell cycle. *Mol cell Biol.* 2003; 23(9): 3173-3185.
229. Guzyk MM, Dyakun KO, Yanytska LV, Pryvrotska IB, Krynytska IYa, Pishel' IM, Kuchmerovska TM. Inhibitors of poly(ADPribose)polymerase-1 as agents providing correction of brain dysfunctions induced by experimental diabetes. *Neurophysiology.* 2017; 49(3): 183-193.
230. Hirst J, Roessler MM. Energy conversion, redox catalysis and generation of reactive oxygen species by respiratory complex I. *Biochim Biophys acta.* 2016; 1857(7): 872-883.
231. Сергійчук ЮТ, Конопельнюк ВВ, Тихоненко ТМ, Кучмеровська ТМ. Корекція окремих ланок обміну серотоніну за експериментального цукрового діабету 2 типу. *Ендокринологія.* 2014; 19(3): 210-216.

232. Drel VR, Pacher P, Stavniichuk R. et al. Poly(ADP-ribose)polymerase inhibition counteracts renal hypertrophy and multiple manifestations of peripheral neuropathy in diabetic Akita mice. *International Journal of Molecular Medicine*, 2011; 4(28): 629–635.
233. Harrison IF, Smith AD, Dexter DT. Pathological histone acetylation in Parkinson's disease: Neuroprotection and inhibition of microglial activation through SIRT 2 inhibition. *Neurosci Lett*. 2018; 666: 48-57.
234. Тихоненко Т, Дякун К, Сергійчук Ю. Мітохондріальна дегідрогеназна активність нервових закінчень мозку щурів. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 2016; 73: 203-207.
235. Flyvbjerg A. The role of the complement system in diabetic nephropath. *Nat Rev Nephrol*. 2017; 13(5): 311-318.
236. Katsarou A, Gudbjörnsdottir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, Jacobsen LM, Schatz DA, Lernmark Å. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3: 17016.
237. Yang H. Oxidative stress and diabetes mellitus. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2011;49(11): 1773–82.
238. Faris Q, Alenzi C. Effect of Nicotinamide on Experimental Induced Diabetes. *Iran J. Allergy Asthma Immunol*. 2009; 8(1): 11–18.
239. Safinaz S, Ibrahim I, Sherine M. Nicotinamide: A cytoprotectant against streptozotocininduced diabetic damage in wistar rat brains. *African J. Biochem. Research*. 2008; 2(8): 174–80.
240. Kuchmerovska TM, Ianitska LV, Guzyk MM, Tykhonenko TM, Pakyrbaeva LV, Dyakun KO. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibitors in correction of experimental diabetic neuropathy. *Materials of VIII Lviv-Lublin conference of experimental and clinical biochemistry*. (Lublin, 18-20 September, 2017). P. 26.

241. Кучмеровська ТМ, Яніцька ЛВ, Тихоненко ТМ, Привроцька ІБ. Нефропротекторний ефект нікотинаміду при експериментальному цукровому діабеті. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2017; 78(2): 31-36.

ДОДАТОК 1

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Кучмеровська ТМ, Донченко ГВ, **Тихоненко ТМ**, Гузик ММ, Яніцька ЛВ, Степаненко СП, Клименко АП. Вплив нікотинаміду на функціональний стан острівцевих клітин підшлункової залози. Укр. біохім. журн. 2012; 84(2):81-88.
2. Сергійчук ЮТ, Конопельнюк ВВ, **Тихоненко ТМ**, Кучмеровська ТМ. Корекція окремих ланок обміну серотоніну за експериментального цукрового діабету 2 типу. Ендокринологія. 2014; 19(3):210-216.
3. Сергійчук ЮТ, **Тихоненко ТМ**, Гузик ММ, Яніцька ЛВ, Кучмеровська ТМ. Вплив сумісної дії нікотинаміду, ацетил-І-карнітину та α -ліпоєвої кислоти на окремі ланки обміну вуглеводів за експериментального діабету 2 типу. Біологічні студії. 2014; 8(3-4):41-52.
4. **Тихоненко ТМ**, Дякун КО, Сергійчук ЮТ. Мітохондріальна дегідрогеназна активність нервових закінчень мозку щурів. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2016; 73:203-207.
5. Кучмеровська ТМ, Яніцька ЛВ, **Тихоненко ТМ**, Привроцька ІБ. Нефропротекторний ефект нікотинаміду при експериментальному цукровому діабеті. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2017; 78(2): 31-36.
6. Яніцька ЛВ, **Тихоненко ТМ**, Гузик ММ, Кучмеровська ТМ. Участь поліолового шляху в розвитку дисфункцій мозку, індукованих експериментальним діабетом: ефект нікотинаміду. Ендокринологія. 2017; 22(3):279-283.
7. Kuchmerovska ТМ, **Tykhonenko ТМ**, Guzyk ММ, Tykhomyrov АО, Yanitska LV. Nicotinamide and Nicotinoyl-Gaba in Prevention of Experimental Diabetic Neuropathy. Jacobs journal of diabetes and endocrinology. 2018; 4(1).

8. Guzyk MM, **Tykhonenko TM**, Dyakun KO, Yanitska LV, Pryvrotska IB, Kuchmerovska TM. Altered sirtuins 1 and 2 expression in the brain of rats induced by experimental diabetes and the ways of its correction. Ukr.Biochem.J. 2019; 91(1):21-29.

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Тихоненко ТМ**, Донченко ГВ, Клименко АП, Ставнійчук РВ, Кучмеровська ТМ. Цитотоксична дія стрептозотоцину на бета-клітини підшлункової залози щурів: ефект N-метилнікотинаміду. Матеріали науково-практичної конференції “Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології” (Десяті Данилевські читання). (Харків, 3-4 березня, 2011). Україна, 2011. С. 128-129.

2. Сергійчук ЮТ, **Тихоненко ТМ**, Кучмеровська ТМ. Сумісний вплив нікотинаміду, ацетил-L-карнітину та α -ліпоєвої кислоти на дисфункцію мозку щурів за цукрового діабету 2-го типу. Матеріали XI Українського біохімічного конгресу опубліковані в Українському біохімічному журналі. (Київ, 6-10 жовтня 2014). Україна, 2014. Т. 86(5), С. 205.

3. Гузик ММ, Сергійчук ЮТ, **Тихоненко ТМ**, Яніцька ЛВ, Кучмеровська ТМ. Амінокислотний склад колагену і типу кісток за експериментального цукрового діабету: ефект нікотинаміду. Ендокринологія. 2014. Т. 19(4), С. 289.

4. Guzyk MM, **Tykhonenko TM**, Donchenko GV, Kuchmerovska TM. PARP-1 inhibition under oxidative stress in pancreatic islet cells. Materials of Joint meeting of the islet study group & beta cell workshop. (Jerusalem, May 3-7, 2015). Israel, 2015. P. 147.

5. **Тихоненко ТМ**, Дякун КО, Яніцька ЛВ, Кучмеровська ТМ. Нейропротекторний вплив сумісної дії нікотинаміду, α -ліпоєвої кислоти та L-ацетил карнітину за експериментального цукрового діабету. Матеріали Третьої міжнародної конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії та

клітинної біології”. (Дніпропетровськ, 24-25 вересня, 2015). Україна, 2015. С. 83-84.

6. Гузик ММ, Дякун КО, **Тихоненко ТМ**, Яніцька ЛВ, Кучмеровська ТМ. Вплив інгібіторів полі ADP-рибopolімерази-1 (PARP-1) на клітини підшлункової залози лінії RINm5f. Матеріали IV Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю “Хімія природних сполук”. (Тернопіль, 21-22 квітня, 2016). Україна, 2016. С. 75-76.

7. Kuchmerovska ТМ, Ianitska LV, Guzyk ММ, **Tykhonenko ТМ**, Pakyrbaeva LV, Dyakun КО. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibitors in correction of experimental diabetic neuropathy. Materials of VIII Lviv-Lublin conference of experimental and clinical biochemistry. (Lublin, 18-20 September, 2017). P. 26.

8. **Тихоненко ТМ**, Гузик ММ, Дякун КО, Кучмеровська ТМ. 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. (Харків, 28 лютого -1 березня, 2019). Україна, 2019. С. 123-124.

9. **Tykhonenko ТМ**, Tykhomyrov АО, Guzyk ММ, Dyakun КО, Kuchmerovska ТМ. The effects of nicotinamide on the brain functional protein markers in prevention of diabetic neuropathy. Materials of 32nd ECNP (European College of Neuropsychopharmacology) Congress. Published in in supplement to the journal European Neuropsychopharmacology (Copenhagen, 7-10 September, 2019). Denmark, 2019, T. 29, supplement 6, P. s554-s555.

10. **Тихоненко ТМ**, Тихомиров АО, Гузик ММ, Дякун КО, Кучмеровська ТМ. 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), С. 242.

11. Kuchmerovska TM, **Tykhonenko TM**, Tykhomyrov AO, Guzyk MM. 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), P. 202-203.