

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О. В. ПАЛЛАДІНА**

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

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна Національної Академії Наук України

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

Офіційні опоненти: член-кореспондент НАМН України,
доктор медичних наук, професор
Маньковський Борис Микитович,
завідувач кафедри діабетології
Національної медичної академії
післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика

доктор біологічних наук, старший
науковий співробітник
Дворщенко Катерина Олександрівна,
завідувач НДЛ “Біохімії”, відділення
біологічних і біомедичних технологій,
ННЦ “Інститут біології” Київського національного
університету ім. Тараса Шевченка

Захист відбудеться « 20 » січня 2020 року о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України за адресою: 01030, м. Київ, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (01030, м. Київ, вул. Леонтовича, 9).

Автореферат розісланий « » грудня 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук

Н. П. Карлова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми.

Вітаміни та їх біологічно активні похідні беруть участь у життєво важливих метаболічних процесах всіх живих організмів. Сучасні біохімічні дослідження в галузі вітамінології спрямовані на з'ясування залучення вітамінів до механізмів внутрішньоклітинного обміну та пошуку нових шляхів прояву їх функціональної дії [Nazarali S. et al., 2017]. Дослідження останніх років поглибили розуміння біологічної дії 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 (АТР), 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 [Johnson S. et al., 2018]. Біологічно активне похідне вітаміну В₃ - нікотиноїл-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 в кров та на відміну від ГАМК долає гематоенцефалічний бар'єр, де може приймати участь у функціонуванні головного мозку. ГАМК є головним гальмівним нейромедіатором в центральній нервовій системі, а також проявляє функціональну активність в інших периферійних тканинах.

Вітамін В₃ та його похідні з успіхом застосовують для лікування багатьох нейродегенеративних та психічних захворювань, зокрема епілепсії, шизофренії, хвороби Паркінсона, психозів [Fricker R. et al., 2018]. Особливо актуальним є питання про застосування нікотинаміду (NAm) в корекції метаболічних порушень при цукровому діабеті (ЦД), який супроводжується численними ускладненнями та є одним із найбільш поширених захворювань на сьогодні [Kharroubi A. et al., 2015]. З кожним роком кількість хворих на ЦД невпинно зростає. 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-го типу, так і 2-го 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» патологічні процеси, які призводять до ушкодження судин, нервів, органів і тканин, що найчастіше є причиною ранньої інвалідності та летальності [Alam U. et al., 2014]. Гіперглікемія може спричинити пошкодження тканини за рахунок таких основних механізмів: збільшення потоку глюкози та інших

моносахаридів через поліоловий шлях, посилене утворення внутрішньоклітинних кінцевих продуктів глікозилування, збільшення експресії рецептора для кінцевих продуктів глікозилування та його активованих лігандів, активація протеїнкінази С (PKC) та гексозамінового шляху. Дані вказують на те, що всі вищезазначені механізми активуються однією послідовною подією: надпродукцією активних форм кисню (АФК) мітохондріями [Giacco F. et al., 2010]. Усунення цих порушень відкриває перспективи профілактики ускладнень ЦД. Інтерес науковців до вивчення цього захворювання не згасає і спонукає їх до пошуку нових підходів до 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 експериментального цукрового діабету 1 типу.

Для досягнення поставленої мети були сформовані 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: 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, NFL, NFH, у той час як вміст NF-κB, BAX, GFAP, NFM 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 NFL, NFH, 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 NFL 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, сідничного 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 та 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 посилання.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури

У розділі проаналізовано стан проблеми щодо механізмів, які лежать в основі розвитку ускладнень цукрового діабету таких як нейропатія, нефропатія тощо. Розглянуто відомості щодо дії NAm та N-GABA для з'ясування можливості їх застосування у терапії цього захворювання та його ускладнень.

Матеріали та методи досліджень

Модель ЦД 1 типу у щурів-самців лінії Вістар (масою 170-270 г) індукували шляхом одноразового введення стрептозотоцину (СТЗ, Sigma, США) внутрішньочеревно у дозі 60 мг/кг маси тіла. Діабетичним щурам після 6 тижнів розвитку патології протягом 14 діб вводили внутрішньочеревно NAm (100 мг/кг) або N-GABA (55 мг/кг). 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); Закон України “Про захист тварин від жорстокого поводження” № 3447-IV, 2006). Для дослідження використовували тканину підшлункової залози, мозку, сідничного нерву, нирок, ізольовані лейкоцити та сироватку крові. Рівень глюкози в крові визначали за допомогою глюкометра “Accu-check” (Roshediagnosics, Швейцарія). Лейкоцити отримували в день експерименту з периферичної крові піддослідних тварин після гемолізу еритроцитів. Використовуючи два параметри протокового цитофлуориметру COULTER EPICS XL (Beckman Coulter, США): розмір (за величиною прямого світлорозсіювання FS) та гранулярність (за бічним світлорозсіюванням SS), оцінювали зміни у перерозподілі між двома основними типами лейкоцитів. Рівень АФК визначали за допомогою 2',7'-дихлорофлуоресцеїн діацетату (DCF-DA, Sigma, США), інтенсивність флуоресценції якого є прямопропорційною вмісту АФК у клітинах. Інтенсивність флуоресценції зразків реєстрували за каналом FL1. Життєздатність клітин визначали за допомогою ядерного флуоресцентного зонду пропідій йодиду (PI, Sigma, США), який проникає лише у мертві клітини та ті, у яких пошкоджена цитоплазматична мембрана за каналом FL3. Зміни мембранного потенціалу мітохондрій клітин визначали за допомогою етилового етеру тетраметилпродаміну (TMRE, Sigma, США), інтенсивність флуоресценції у зразках якого реєстрували за каналом FL2.

Гістологічні дослідження проводили згідно методів [Luna L. et al., 1968; Geuna S. et al., 2004]. Морфометричний аналіз проводили з використанням мікроскопа Olympus BX 51 та програмного забезпечення CarlZeiss (AxioVision SE64 Rel.4.9.1).

Вміст метаболітів та активність ензимів визначали з урахуванням концентрації відповідних метаболітів та констант рівноваги дегідрогеназ згідно методів [Bergmeyer H., 1963].

Вміст протеїнів оцінювали методом Вестер-блот аналізу. Денситометричний аналіз проведено за допомогою програмного забезпечення TotalLab TL120 (Nonlinear Inc, США), вміст протеїну представлено в умовних одиницях (ум. од.). Концентрацію протеїнів визначали за стандартними методами [Pace C. et al., 1995; Lowry O. et al., 1951].

Імуногістохімічний аналіз проводили згідно стандартного протоколу [Ku S. et al., 2006]. Результати були оцінені за допомогою мікроскопа CarlZeiss LSM 510 Мета (Carl Zeiss, Німеччина). Обробка результатів здійснювалась за допомогою програмного забезпечення Zeiss ZEN 2009.

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) та стандартної помилки середнього значення ($\pm m$). Різницю вважали статистично достовірною при $P < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

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 у крові піддослідних тварин. На початку проведення експериментів рівень глюкози крові та маса тіла тварин були практично однакові у всіх досліджуваних групах (табл. 1). Наприкінці експерименту рівень глюкози у контрольній групі залишався без змін, у діабетичній групі - збільшився у 5 разів порівняно з контрольною групою. При введенні діабетичним щурам NAm достовірних змін рівня глюкози крові не було виявлено, введення N-GABA призводило до незначного зниження цього показника (у 1,57 рази) порівняно з діабетичною групою (табл. 1). Через 8 тижнів розвитку ЦД 1 типу маса тіла діабетичних щурів зменшилася на 33,53 % порівняно з контрольною групою. Введення діабетичним щурам NAm та N-GABA протягом 14 діб не призводило до зростання маси тіла тварин порівняно з діабетичною групою (табл. 1).

Таблиця 1. Маса тіла та рівень глюкози в крові щурів, $M \pm m$ ($n = 3-4$)

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 \pm 20,2	4,7 \pm 0,5	311,7 \pm 18,3	4,2 \pm 0,7
Діабет (Д)	211,2 \pm 17,3	4,7 \pm 0,5	207,2 \pm 15,3*	23,3 \pm 3,0*
Д+NAм	207,5 \pm 15,4	4,7 \pm 0,5	204,3 \pm 12,4*	21,9 \pm 4,7*
Д+N-GABA	212,1 \pm 11,2	4,7 \pm 0,5	217,1 \pm 10,2*	14,8 \pm 3,5*#

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

Порушення метаболізму глюкози в організмі також призводить до дисфункцій острівців, що супроводжується втратою β -клітин і зниженням секреції інсуліну, що виникає, як наслідок цукрового діабету та гіперглікемії [Lee Y. et al., 2013]. За

результатами гістологічних досліджень зрізів підшлункової залози піддослідних тварин було виявлено, що підшлункова залоза інтактних щурів структурно незмінена (Рис. 1). У діабетичних тварин виявлено морфологічні зміни у підшлунковій залозі: в острівцях Лангерганса спостерігалася значна кількість ушкоджених панкреатоцитів в стані набряку та вогнищеве ураження, екзокринна складова залози без ознак структурних змін. За введення NAm протягом двох тижнів було виявлено набряк поодиноких панкреатоцитів, ацинуси залози були неушкоджені.

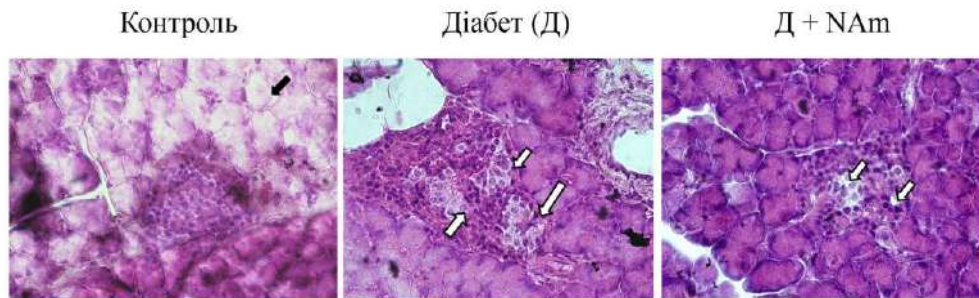


Рисунок 1. Гістологічні зміни підшлункової залози щурів. Пофарбовано гематоксилін-еозином ($n = 4-5$) Примітка: **←** гіпохромні ацинуси. **↔** ушкоджені панкреатоцити з набряком цитоплазми

Високий рівень глюкози у крові призводить до запальних процесів, у розвитку яких важливу роль відіграють лейкоцити, одна із ланок імунної системи людини. За патологічних станів відповідь цих клітин на інтенсифікацію запалення буде змінюватися. Нами встановлено, що за цукрового діабету загибель лейкоцитів крові підвищується у 4,65 рази порівняно з контрольною групою тварин. Застосування NAm або N-GABA при їх двотижневому введенні призводило до пригнічення загибелі лейкоцитів крові у 2,85 та 1,52 відповідно, внаслідок цього життєздатність досліджуваних клітин підвищувалася порівняно з групою діабетичних тварин. Причому NAm мав більш виражений ефект на життєздатність клітин у порівнянні з N-GABA. У свою чергу, знижена життєздатність лейкоцитів може призводити до змін у перерозподілі між їхніми двома основними типами. Дійсно, було показано, що за цукрового діабету відбуваються зміни у перерозподілі між гранулоцитами та агранулоцитами у крові порівняно з контрольною групою щурів, в бік підвищення кількості гранулоцитів (збільшувалася у 2,25 рази). Введення NAm або N-GABA призводило до зниження їхньої кількості у 1,28 та 1,57 рази порівняно з групою діабетичних тварин та відновлення рівноваги між кількістю гранулоцитів та агранулоцитів, відповідно для досліджуваних сполук. За виявлених змін у лейкоцитах спостерігали підвищення базального рівня продукування АФК на 60% у порівнянні із контрольною групою тварин. При цьому введення NAm або N-GABA призводило до зниження рівня АФК у лейкоцитах на 27% та 32% відповідно, порівняно з групою діабетичних тварин. Подібну картину спостерігали у гранулоцитах та агранулоцитах. За цих умов у лейкоцитах діабетичної групи тварин відбувається зниження мітохондрійного мембранного потенціалу в 1,43 рази порівняно з групою контрольних щурів. Застосування NAm або N-GABA сприяло

підвищенню цього показника в 1,16 та 1,22 рази порівняно з групою діабетичних тварин, відповідно.

Відомо, що периферійна діабетична нейропатія, одне із пізніх ускладнень ЦД, розвивається майже в 50% хворих. Серед багатьох патогенетичних процесів, які призводять до розвитку діабетичної нейропатії, значне місце належить активації поліолового шляху обміну глюкози в багатьох клітинах та тканинах. Дійсно, як свідчать отримані дані в сідничному нерві діабетичних щурів вміст сорбітолу збільшувався в 10,44 рази порівняно з контролем, що узгоджується з даними інших дослідників [Singh R. et al., 2014]. Хронічне введення NAm або N-GABA діабетичним щурам призводило до зниження вмісту сорбітолу у 3,63 та 1,53 рази відповідно. Тобто, NAm, як попередник біосинтезу NAD, здатен регулювати поліоловий шлях обміну глюкози, запобігаючи акумуляції сорбітолу, при чому більш ефективно порівняно з N-GABA. Це може вказувати на те, що цей шлях не є основною ланкою реалізації нейротропної дії N-GABA (табл. 2).

Таблиця 2. Вміст сорбітолу в сідничному нерві щурів, мкмоль/г тканини, $M \pm m$, $n=3-4$

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#

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

Значна акумуляція сорбітолу у сідничному нерві діабетичних щурів дозволяє передбачити, що активність ключових ензимів поліолового шляху обміну глюкози у сідничному нерві також буде змінюватися: активність альдозоредуктази підвищувалася на 80 %, в той час як активність сорбітолдегідрогенази, навпаки, знижувалася на 54,3% порівняно з контролем. За введення NAm або N-GABA спостерігали зворотню картину: активність альдозоредуктази знижувалась на 29,3 і 24,3 % відповідно, проте активність сорбітолдегідрогенази практично не змінювалася порівняно з показниками діабетичних тварин. Тобто, досліджувані сполуки проявляли коригуючу дію на активність альдозоредуктази, що впливало на нормалізацію функціонування поліолового шляху обміну глюкози (табл. 3).

Таблиця 3. 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

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

Метаболічні зміни у сідничному нерві супроводжуються структурними змінами. Отримані дані гістологічного аналізу зрізів сідничного нерва досліджуваних груп тварин показали, що у контрольній групі тварин структурна

організація нерва чітко диференціюється, спостерігаються сполучнотканинні елементи епіневрію і периневрію, ендоневрію – 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 [Lirk P. et al., 2015] (рис. 2).

Ці зміни у нервах діабетичних щурів супроводжувалися змінами щільності нервових 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 збільшення щільності нервових волокон.

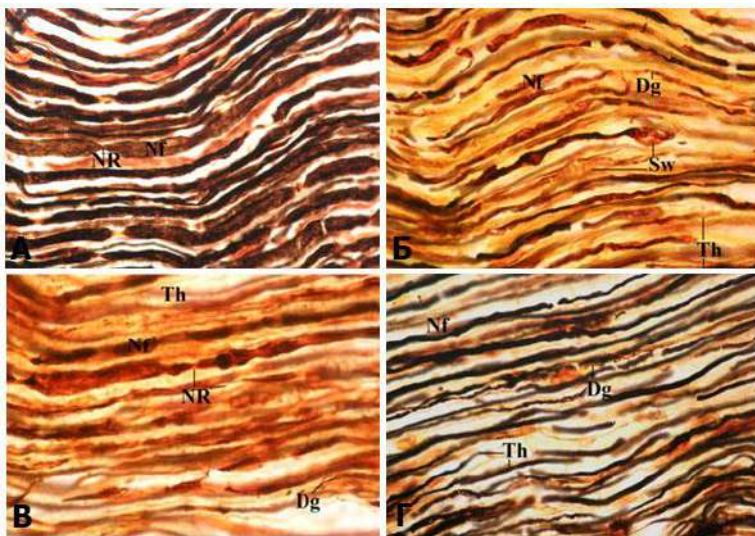


Рисунок 2. Гістологічна будова сідничного нерва щурів контрольної та дослідних груп: А – контроль, Б – діабет (Д), В – Д+NAм, Г – Д+N-GABA. Примітка: Nf - нервові волокна у сідничному нерві щура; Sw - мієліновий фокальний набряк, NR - вузол Ранв'є, Th - товщина нервових волокон, Dg - дегенерація нервових волокон

Результати показали, що за ЦД 1 типу, не тільки у сідничних нервах, але і в мозку відбувалася активація поліолового шляху обміну глюкози. Було показано, що за ЦД 1 типу відбувається накопичення сорбітолу у мозку тварин, причому у різному ступені в залежності від його відділу. Одержані дані свідчать про те, що у гіпоталамусі вміст сорбітолу підвищений на 55,6%, у корі великих півкуль – на 66,7%, у гіпокампі – на 125,0%, у мозочку – на 93,9%, у стовбурі – на 54,8% та у продовгуватому мозку – на 79,5% порівняно з відповідними показниками у контрольних тварин. Результатом накопичення сорбітолу в окремих відділах мозку діабетичних тварин є збільшення його вмісту в цілому мозку в 1,7 рази порівняно з контрольними тваринами. Введення NAm діабетичним щурам призводило до зниження вмісту сорбітолу у цілому мозку на 39%, а також у всіх досліджуваних його відділах, причому найбільш виражено у гіпокампі та мозочку. Стає очевидним, що активність ензимів поліолового шляху обміну глюкози за діабету у мозку також зазнає змін: активність альдозоредуктази підвищилася на 74 %, у той час як незначне підвищення активності сорбітолдегідрогенази було не достовірним порівняно з контролем. За введення NAm активність альдозоредуктази знижувалась на 29%, активність сорбітолдегідрогенази за його дії практично не змінювалася порівняно з показниками діабетичної групи тварин.

За активації поліолового шляху обміну глюкози не виключено, що будуть відбуватися зміни навіть на молекулярному рівні клітин.

За різних експериментальних моделей показано, що дисфункція нейронів супроводжується активацією NF-κB та експресією прозапальних цитокінів [Cai D. et al., 2012], а також, що нейрональний апоптоз, який пов'язаний з активацією NF-κB, може відігравати важливу роль у втраті нейронів та порушенні когнітивної функції [Li H. et al., 2013]. Тому доцільно було оцінити вміст протеїну транскрипційного фактору NF-κB. За даними Вестерн-блот аналізу вміст протеїну NF-κB збільшувався у 3,5 рази у мозку діабетичних щурів порівняно з контролем. Існують дані що в гіпокампі діабетичних щурів спостерігається не тільки надпродукція АФК, але також спостерігається стійка активація NF-κB [Alvarez-Nölting R. et al., 2012]. Хронічне введення NAm діабетичним щурам викликало незначне зниження вмісту протеїну NF-κB (у 1,31 рази), тоді як вміст цього протеїну більш помітно знижувався при використанні N-GABA (у 1,73 рази) (рис. 3).

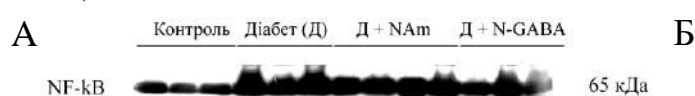
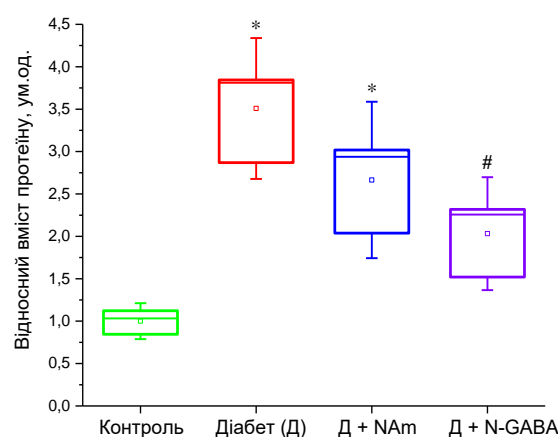


Рисунок 3. Вестерн-блот аналіз протеїну транскрипційного фактору NF-κB у тканині мозку щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б), $M \pm m$ ($n = 3-4$). * $P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”; # $P < 0,05$ порівняно з групою “Діабет”



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 у діабетичній групі збільшився у 2,02 рази порівняно з контрольною групою (рис. 4). Така надекспресія проапоптотичного протеїну ВАХ може призвести до мітохондрійної дисфункції та навіть до загибелі клітин. Хронічне введення NAm призводило до незначного зниження вмісту цього протеїну (у 1,19 рази), проте N-GABA знижував цей показник у 1,96 рази, порівняно з діабетичною групою.

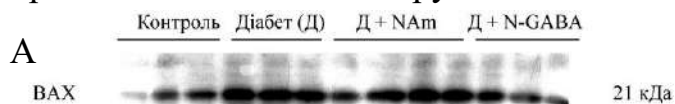
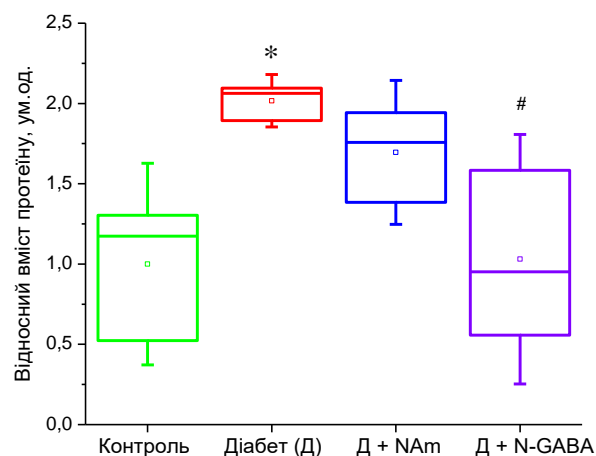


Рисунок 4. Вестерн-блот аналіз проапоптотичного протеїну ВАХ у тканині мозку щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б), $M \pm m$ ($n = 3-4$). * $P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”; # $P < 0,05$ порівняно з групою “Діабет”



Цереброваскулярна дисфункція, індукована ЦД, може бути також пов'язана зі зміною вазодилататорних шляхів, які підтримують мозковий кровотік за фізіологічних умов. За цих індукованих діабетом змін було оцінено вміст протеїну nNOS. Було показано, що у мозку діабетичних щурів вміст протеїну nNOS знижувався у 1,38 рази, у той час як за впливу NAm або N-GABA вміст цього протеїну підвищувався у 1,85 та 1,32 рази відповідно, порівняно з діабетичною групою тварин, що може свідчити про принаймні часткове відновлення функцій мозку (рис. 5). Зниження вмісту протеїну nNOS за ЦД 1 типу спостерігали й інші дослідники [Arrick D. et al., 2007].

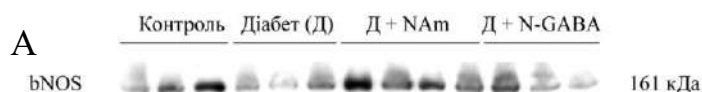
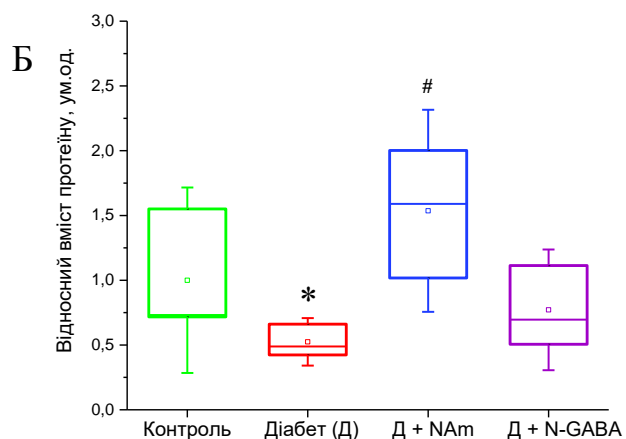


Рисунок 5. Вестерн-блот аналіз протеїну нейрональної NO-синтази у тканині мозку щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б), $M \pm m$ ($n = 3-4$). $*P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”; $\#P < 0,05$ порівняно з групою “Діабет”



Фактор росту ендотеліальних клітин судин є ключовим регулятором стану структури та функцій кровоносних судин, але згідно останніх даних VEGF також бере участь у процесах нейродегенерації [Rosenstein J. et al., 2010]. Ми встановили, що вміст протеїну VEGF у мозку діабетичних щурів знижувався у 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 протеїну VEGF підвищувався у 4,53 рази порівняно з діабетичною групою тварин (рис. 6).

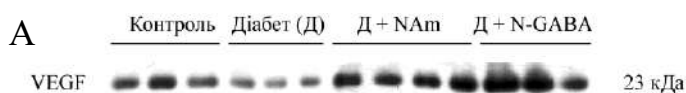
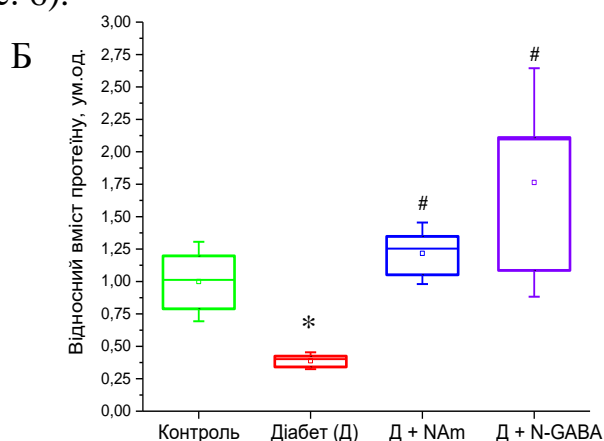


Рисунок 6. Вестерн-блот аналіз протеїну фактору росту ендотеліальних клітин судин у тканині мозку щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б), $M \pm m$ ($n = 3-4$). $*P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”; $\#P < 0,05$ порівняно з групою “Діабет”



Існують дані, що нейродегенеративні захворювання супроводжуються розвитком реактивного гліозу за рахунок підвищення вмісту і деградації GFAP у тканині мозку [Zhang Z. et al., 2014; Lopategui Cabezas I. et al., 2014; Członkowska A. et al., 2011]. Тому ми вирішили з'ясувати, чи не відбуваються зміни вмісту та 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. 7 та 8). Деякі механізми можуть

пояснювати реакцію астроцитів за цукрового діабету. Ці механізми включають активацію поліолового шляху, глікозилювання протеїнів, порушений гомеостаз кальцію і оксидативний стрес. Існують дані, які підтверджують, що збільшення вмісту GFAP та продуктів його деградації є реакцією астроцитів на оксидативний стрес [Liu B. et al., 2017].

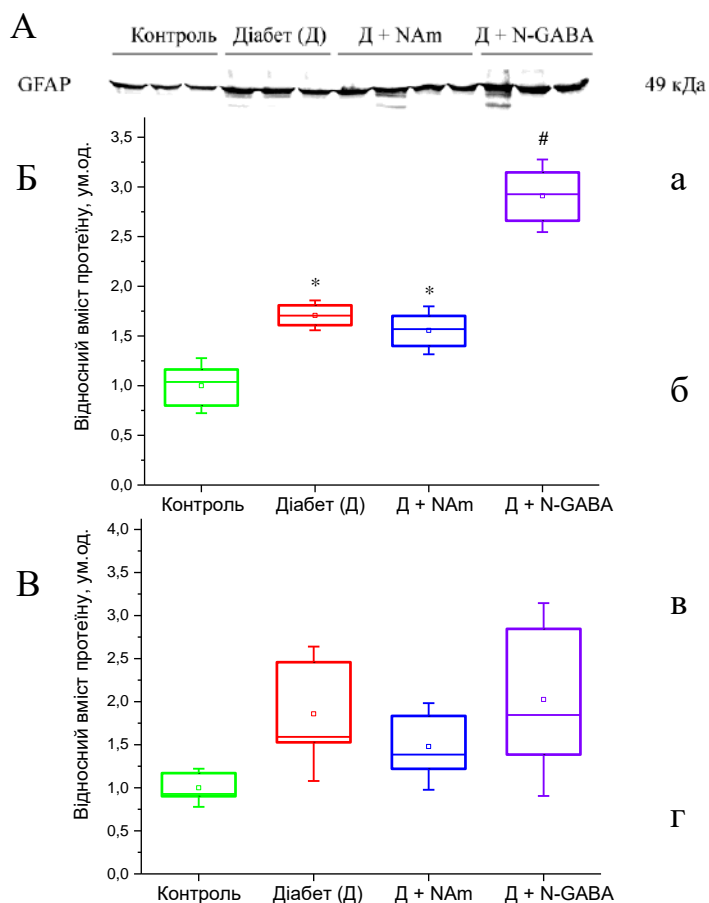


Рисунок 7. Вестерн-блот аналіз кислого гліального фібрилярного протеїну та його фрагментів у тканині мозку щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б-загальний вміст GFAP, В-фрагменти деградації), $M \pm t$ ($n = 3-4$). * $P < 0,05$ порівняно з групою "Контроль"; # $P < 0,05$ порівняно з групою "Діабет"

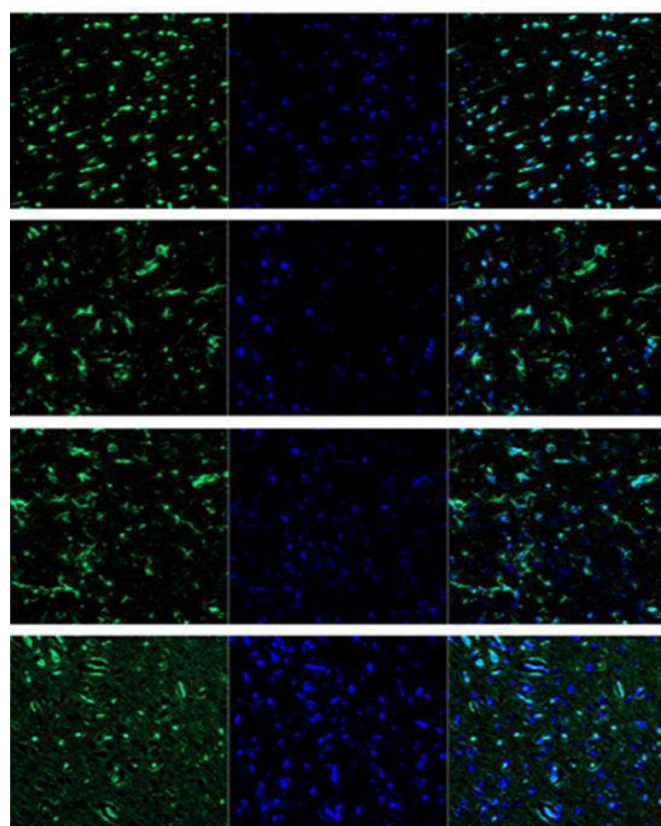


Рисунок 8. Імуногістохімічний аналіз кріозрізів мозку щурів за умов ЦД 1 типу. Зрізи оброблені антитілами проти GFAP (зелений колір) та ядра профарбовані флуоресцентним барвником Hoechst-33342 (синій колір), конфокальна мікроскопія: а) контроль, б) діабет (Д), в) Д+NAm, г) Д+N-GABA

Застосування NAm не призводило до зниження вмісту GFAP у мозку діабетичних щурів. Однак, N-GABA підвищував вміст цього протеїну у 1,7 рази порівняно з діабетичною групою тварин. Оскільки за введення N-GABA також було виявлено підвищення вмісту протеїну віментину (у 2,39 рази порівняно з контрольною групою тварин), 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 протеїну віментину в мозку діабетичних тварин та діабетичних тварин, яким вводили NAm порівняно з контролем (рис. 9).

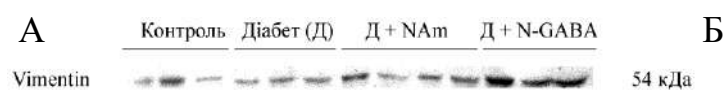
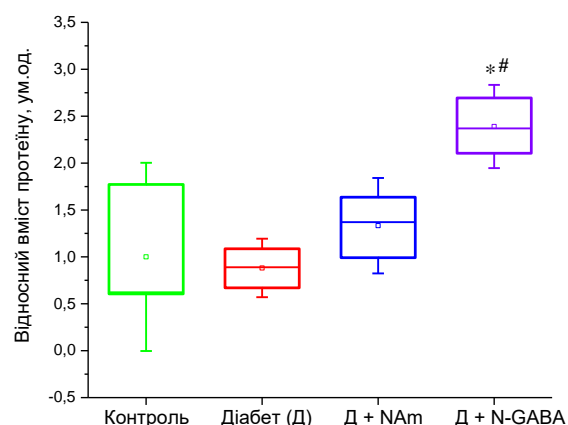


Рисунок 9. Вестерн-блот аналіз протеїну віментину у тканині мозку щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б), $M \pm m$ ($n = 3-4$). $*P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”; $\#P < 0,05$ порівняно з групою “Діабет”



Результати імуногістохімічних досліджень кріозрізів мозку щурів узгоджуються з даними Вестерн-блот аналізу GFAP головного мозку (рис. 8).

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 [Yuan A. et al., 2017]. Було виявлено зниження вмісту протеїнів нейрофіламентів легкого ланцюга (NF-L) у 1,80 рази та важкого ланцюга (NF-H) у 1,66 рази у мозку діабетичних щурів, при цьому вміст протеїну нейрофіламентів середнього ланцюга (NF-M) збільшувався у 2,66 рази порівняно з відповідним показником контрольних тварин (рис. 10).

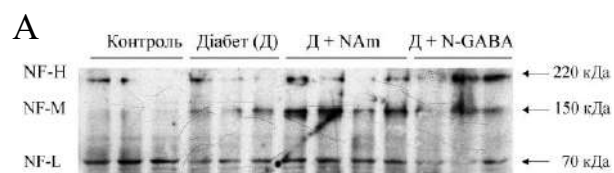
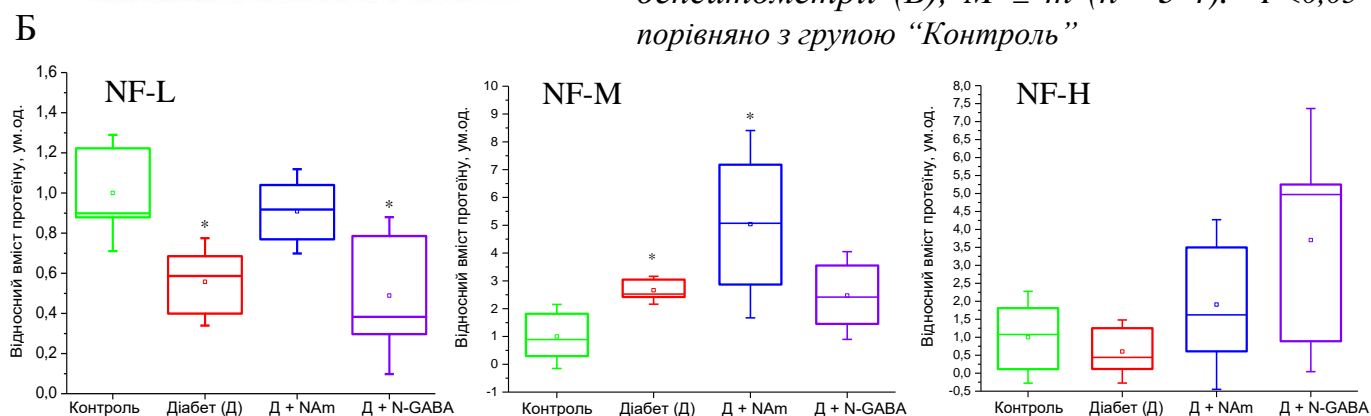


Рисунок 10. Вестерн-блот аналіз протеїнів нейрофіламентів у тканині мозку щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б), $M \pm m$ ($n = 3-4$). $*P < 0,05$ порівняно з групою “Контроль”



Застосування NAm викликало підвищення вмісту протеїнів NF-H у 1,91 рази, NF-M у 1,89 рази та NF-L у 1,63 рази порівняно з діабетичною групою. Введення N-GABA викликало більш помітне збільшення вмісту протеїну NF-H (у 6,14 рази), але він не впливав на вміст протеїнів NF-L і NF-M порівняно з діабетичною групою тварин (рис. 10).

До порушень функціонування мозку можуть приводити зміни у структурі мієліну, важливим 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% (рис. 11), що узгоджується з даними інших дослідників [Cermenati G. et al., 2017]. Вміст МВР у мозку діабетичних щурів за введення NAm не відрізнявся від такого, як у діабетичній групі. При цьому застосування N-GABA приводило до незначного відновлення вмісту МВР (у 1,42 рази) порівняно з групою діабетичних щурів.

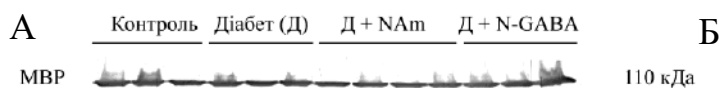
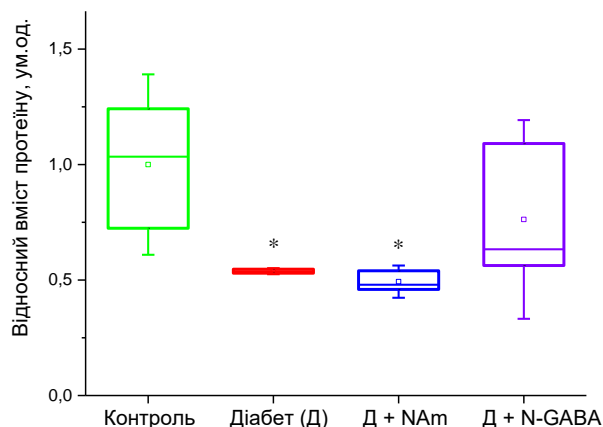


Рисунок 11. Вестерн-блот аналіз основного протеїну мієліну у тканині мозку щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б), $M \pm m$ ($n = 3-4$). $*P < 0,05$ порівняно з групою "Контроль"



Оскільки нами були виявлені зміни в мозку, то не виключено, що порушення можуть супроводжуватися втратою структурної цілісності клітин мозку, дезінтеграцією гематоенцефалічного бар'єру. Тому було також оцінено у сироватці крові вміст GFAP та протеїну NF-L. За ЦД спостерігали підвищення рівня GFAP та протеїну NF-L у сироватці крові у 357,1 разів та у 5,6 разів відповідно (рис. 12 та 13). Існують дані, що нейродегенеративні захворювання супроводжуються підвищенням вмісту GFAP та протеїну NF-L у крові [Su W. et al., 2012; Disanto G. et al., 2017; Byrne L. et al., 2017].

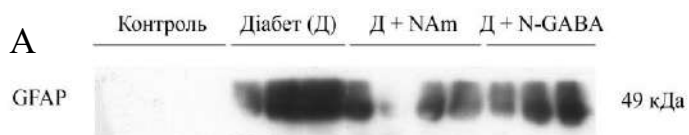


Рисунок 12. Вестерн-блот аналіз кислого гліального фібрилярного протеїну у сироватці крові щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б), $M \pm m$ ($n = 3-4$). $*P < 0,05$ порівняно з групою "Контроль"

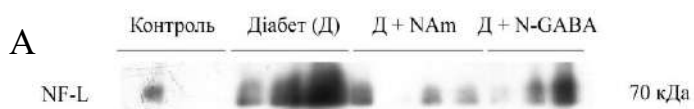
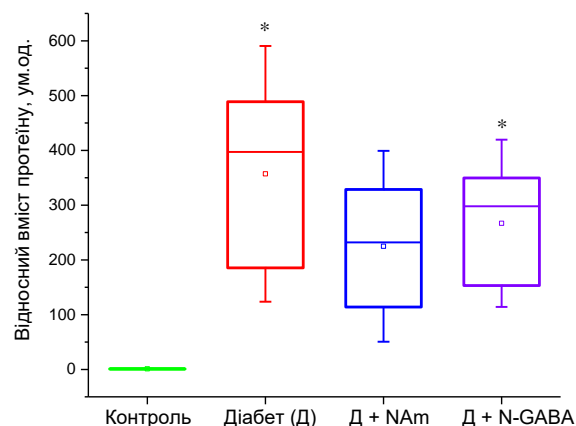
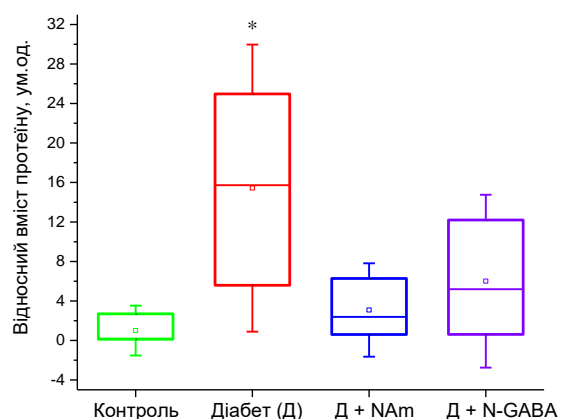


Рисунок 13. Вестерн-блот аналіз протеїну нейрофіламентів легкого ланцюга у сироватці крові щурів: блотограма (А) та результати денситометрії (Б), $M \pm m$ ($n = 3-4$). $*P < 0,05$ порівняно з групою "Контроль"



Застосування NAm або N-GABA обумовлювало зниження вмісту GFAP в 1,6 та 1,3 рази, а також вмісту протеїну NFL у 5,0 та 2,6 рази відповідно для цих сполук у сироватці крові діабетичних щурів.

Механізми регуляторної дії NAm за цукрового діабету та його ускладнень можуть реалізуватися через NAD, який залучений у процесах полі-ADP-рибозилування, ацетилювання, а також було показано нові аспекти його дії, які здійснюються на рівні вмісту нейроспецифічних протеїнів, структурних протеїнів, транскрипційного фактору NF-κB. Корируючий вплив N-GABA за досліджуваних патологічних станів може здійснюватися як за рахунок впливу на нейромедіаторні системи, а також, як нами виявлено, на рівні вмісту нейроспецифічних протеїнів, протеїнів цитоскелету, на рівні секреції інсуліну, а особливо на рівні вмісту MBP. Дія досліджуваних сполук проявляється на всіх взаємопов'язаних між собою процесах, а саме гіперглікемією, активацією оксидативного стресу, розвитком реактивного гліюзу та дисфункціями судин, апоптозом, демієлінізацією, що свідчить про те, що вони можуть бути основою для пошуку нових терапевтичних засобів для лікування цукрового діабету та його ускладнень.

ВИСНОВКИ

На основі теоретичного узагальнення результатів наукової літератури та аналізу власних експериментальних досліджень з'ясовано нові аспекти щодо механізмів дії нікотинаміду та нікотиноїл-ГАМК за біохімічних порушень, зокрема активації апоптозу, порушення модуляції експресії ангіогенних факторів, астрогліальної відповіді, структурних та морфологічних змін у нервових клітинах, індукованих ЦД, а також експериментально обґрунтовано доцільність застосування сполук, що вивчалися, з метою корекції виявлених змін у досліджуваних клітинах, тканинах та органах.

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

2. Продемонстровано, що NAm та N-GABA пригнічували активацію поліолового шляху обміну глюкози у сідничному нерві, вогнищевий набряк волокон, процеси демієлінізації, дегенерації окремих нервових волокон, підвищували щільність нервових волокон, запобігаючи його структурним змінам, які виникають за ЦД.

3. Встановлено, що за ЦД рівень активації поліолового шляху обміну глюкози у мозку був нижчим, ніж у сідничному нерві. Введення NAm діабетичним щурам обумовлювало зниження вмісту сорбітолу у цільному мозку, а також у всіх досліджуваних його відділах, причому найбільш виражено у гіпокампі та мозочку.

4. Вперше встановлено, що на тлі діабетичної енцефалопатії відбуваються наступні зміни вмісту протеїнів: вміст nNOS, VEGF, MBP, NFL, NFH знижувався, у той час як вміст NF-κB, BAX, GFAP, NFM підвищувався, однак при цьому вміст віментину не змінювався. NAm та N-GABA проявляли коригуючий ефект на вміст

nNOS, VEGF, NF-κB, BAX, при чому дія NAm була більш виражена на вміст NFL, NFH, а N-GABA на вміст MBP. На тлі цієї патології спостерігали підвищення вмісту віментину та GFAP за введення N-GABA, що може бути результатом проліферації астроцитів як адаптаційно-захисної реакції.

5. Розвиток ЦД та його ускладнень призводить до суттєвих змін у ключових метаболічних процесах у клітинах, тканинах та органах організму, а механізми регуляторної дії NAm та N-GABA можуть реалізуватися як їх безпосереднім впливом на досліджувані процеси, так і опосередковано шляхом нормалізації вмісту транскрипційного фактору NF-κB, нейроспецифічних протеїнів, протеїнів цитоскелету.

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. *(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 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). *(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 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. *(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, Ставнійчук РВ, Кучмеровська ТМ. Цитотоксична дія стрептозоточину 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. 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.

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, Yanitska 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 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 supplement to the journal European Neuropsychopharmacology (Copenhagen, 7-10 September, 2019). Denmark, 2019.

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 ТМ, **Tykhonenko ТМ**, Tykhomyrov АО, Guzyk ММ. 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.

АНОТАЦІЯ

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, 2020.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню механізмів дії вітаміну В₃ та його похідних за умов експериментального цукрового діабету 1 типу. Встановлено, що NAm та N-GABA пригнічуючи активацію поліолового шляху обміну глюкози в мозку, його структурах та у сідничному нерві, запобігають структурним змінам в цих органах, відновлюючи їх функції. Виявлено, що розвиток нейродегенеративних змін у мозку супроводжується структурною перебудовою протеїнів цитоскелету, дисфункціями кровоносних судин, розвитком апоптозу та реактивного гліюзу, порушенням структурної цілісності клітин мозку та проникності гематоенцефалічного бар'єру. 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, NFL, NFH, у той час як вміст NF-κB, BAX, GFAP, NFM підвищувався, а 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, причому NAm мав більш виражений нормалізуючий ефект на вміст NFL, NFN, а N-GABA - на вміст MBP. Також нами вперше встановлено, що введення N-GABA призводило до підвищення вмісту віментину та GFAP, що може бути результатом проліферації астроцитів як адаптаційно-захисної реакції. Було вперше виявлено, що NAm та N-GABA запобігають порушенню структурної цілісності клітин мозку та проникності гематоенцефалічного бар'єру, доказом чого було зниження вмісту GFAP та NFL у сироватці крові діабетичних тварин.

Встановлено, що опосередковане NAm та N-GABA регулювання NAD-залежних процесів за ЦД 1 типу та його ускладнень здійснюється на тлі існуючого функціонального зв'язку між гіперглікемією, активацією оксидативного стресу, розвитком реактивного гліозу та дисфункціями судин, апоптозом, демієлінізацією нейронів за розвитку діабетичної нейропатії. Таким чином досліджувані сполуки можуть бути перспективними в якості коригуючих сполук для лікування цукрового діабету та його ускладнень.

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

SUMMARY

Tykhonenko T.M. “Mechanisms of the action of vitamin B₃ and its derivatives under experimental diabetes mellitus”. – Manuscript.

Thesis for scientific degree of candidate of biological sciences by specialty 03.00.04 – Biochemistry. – Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2020.

Dissertation is devoted to studying the mechanisms of action of vitamin B₃ and its derivatives in conditions of experimental type 1 diabetes mellitus. It has been established that NAm and N-GABA inhibiting the activation of the polyol pathway of exchange of glucose in the brain, its structures and in the sciatic nerve, prevent structural changes in these organs, restoring their functions. It was revealed that the development of neurodegenerative changes in the brain is accompanied by a structural transformation of cytoskeleton proteins, blood vessel dysfunctions, the development of apoptosis and reactive gliosis, a violation of the structural integrity of brain cells, and a violation of the permeability of the blood-brain barrier. For the first time, it has been shown that in the brain of diabetic animals there are significant changes in the expression of key proteins, which is confirmed by the decrease in the content of nNOS, VEGF, MBP, NFL, NFN, while the content of NF-κB, BAX, GFAP, NFM increased, however the content of vimentin did not change. It was first established that the mechanisms of action of NAm and N-GABA are realized both through NAD-dependent processes and indirectly by involving other processes at the level of protein content, since NAm and N-GABA exhibited a correction effect on nNOS, VEGF, NF-κB, BAX, with NAm having a more normalizing effect on the content of NFL, NFN, and N-GABA on the content of MBP. We also first found that the administration of N-GABA resulted in an increase in the content

of vimentin and GFAP, which may be the result of the proliferation of astrocytes as an adaptation-protective reaction. It was discovered for the first time that NAM and N-GABA prevented the violation of the structural integrity of the brain cells and impaired permeability of the blood-brain barrier, which was evidence of a decrease of GFAP and NFL in the serum of diabetic animals.

It has been established that the mediated NAM and N-GABA regulation of NAD-dependent processes with type 1 diabetes and its complications are carried out against the background of the existing functional relationship between hyperglycemia, activation of oxidative stress, development of reactive gliosis and vascular dysfunctions, apoptosis, demyelination of neurons in the development of diabetic neuropathy. Thus, the compounds studied can be promising as corrective compounds for the treatment of diabetes mellitus and its complications.

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