НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

**Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна**

**РЕФЕРАТ**

# «МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ КОРИГУВАЛЬНОЇ ДІЇ НІКОТИНАМІДУ ТА ХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛУ ЗА МЕТАБОЛІЧНИХ ПОРУШЕНЬ ІНДУКОВАНИХ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ»

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **ГУЗИК Михайло Михайлович** – | | кандидат біологічних наук, науковий співробітник Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України | |
|  | |  | |
| **ЛАБУДЗИНСЬКИЙ Дмитро Олегович**   – | | молодший науковий співробітник Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України | |
|  | |  | |
| **ТИХОНЕНКО Тетяна Михайлівна**  – | | аспірант Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України | |
|  |  | |

Київ-2017

# Реферат роботи

Представлена робота **“**Молекулярні механізми коригувальної дії нікотинаміду та холекальциферолу за метаболічних порушень індукованих цукровим діабетом” є циклом наукових праць, присвячених вищезазначеній темі.

**Актуальність теми.**

За даними Міжнародної федерації діабету (IDF) у 2015 році кількість хворих становила 415 млн людей та за прогнозами у 2040 році кількість хворих у світі становитиме 642 млн., що є причиною ранньої інвалідності і летальності серед населення практично всіх країн світу. У зв’язку з цим профілактика та лікування цукрового діабету (ЦД) є актуальною медико-соціальною проблемою. За розвитку цукрового діабету виникають численні ускладнення, які призводять до патологічних змін у функціонуванні багатьох клітин, тканин та органів [Brownlee M., 2005]. Однак, патогенетичні механізми, які залучені до розвитку ЦД та його ускладнень, на даний час з’ясовані недостатньо.

Згідно даних літературних джерел нікотинамід (NAm), який володіє широким спектром дії та здатен за експериментальних умов запобігати руйнуванню β-клітин підшлункової залози, послужило поштовхом для дослідження механізмів дії вітаміну В3 та його біологічно активних похідних у патогенезі діабету та його ускладнень. Відомо, що NAm, біологічно активна форма вітаміну В3, є попередником біосинтезу нікотинамідаденіндинуклеотиду (NAD), який, у свою чергу, залучений до важливих ланок клітинного метаболізму як коензим численних дегідрогеназ [Liu T. et al, 2014], субстрат сADP-рибози, ліганду ріанідинових рецепторів [Triggle C. R., 2007, D. Prieto, et al, 2014], а також субстрат процесів полі-ADP-рибозилювання протеїнів [Szabo C. 2009, Lee S.-Y., Choi M. E., 2015]. NАm як інгібітор PARP, знижуючи використання NAD для полі-АДФ-рибозилювання, може відновлювати функції ще незруйнованих β-клітин. Розвиток дисфункцій цих клітин супроводжується численними біохімічними порушеннями.

Ядерний ензим полі-ADP-рибозо-полімераза–1 (PARP-1) був ідентифікований як найбільш важливий ензим ексцизійної репарації пошкоджених основ при однониткових розривах ДНК, індукованих вільними радикалами та продуктами ліпопероксидації як у нормі, так і за різних захворювань, для яких характерним є розвиток оксидативно-нітрозативного стресу [Rosado M. M., et al, 2013]. За умов надактивації PARP-1 відбувається істотне зниження внутрішньоклітинного вмісту NAD+ та АТР, що є однією із основних причин некротичної загибелі клітин, а сам ензим може бути своєрідним “молекулярним перемикачем”, який визначає шляхи виходу клітин із стану оксидативного та генотоксичного стресу.

Так, одним із перспективних напрямків лікування ЦД та його ускладнень може бути створення препаратів, які б не лише специфічно інгібували PARP-1, але водночас володіли протизапальними та антиоксидантними властивостями. У зв’язку з цим, було вирішено дослідити вплив нікотинаміду та холекальциферолу на процеси полі-ADP-рибозилювання та спряжені із ним прозапальні та прооксидантні механізми патогенезу цукрового діабету і його ускладнень.

Результати епідеміологічних досліджень останніх років також демонструють важливу роль холекальциферолу (вітаміну D3) в зниженні ризику виникнення ЦД та в корекції порушень, що супроводжують розвиток цього захворювання [Eliakim-Ikechukwu C.F., and Obri A.I., 2009]. Відомо, що холекальциферол є важливим регулятором обміну кальцію і фосфору в організмі хребетних, ключовим фактором остеогенезу та ремодуляції кісткової тканини. Проте, дослідження останніх років показують, що гормонально активні форми вітаміну D3 виявляють інші біологічні ефекти, не пов’язані з участю в регулюванні гомеостазу кісткової тканини. Зокрема, встановлено здатність вітаміну D3 впливати на функціональну активність клітин імунної системи, таких як моноцити, макрофаги, дендритні клітини (DCs), а також Т- і В-лімфоцити, результатом чого є модуляція як вродженої, так і набутої імунної відповіді. Більш того, гормонально активні форми холекальциферолу залучені до транскрипційної регуляції понад 300 генів в організмі ссавців, зокрема генів факторів прозапальних процесів. З урахуванням цього, було поставлено завдання дослідити функціонування елементів NF-кB-асоційованих сигнальних шляхів та плейотропні нормалізуючі ефекти холекальциферолу в організмі за умов діабет-індукованого D3-дефіциту та його терапевтичного введення.

Таким чином, результати проведених досліджень можуть слугувати підгрунтям для розробки комплексного препарату на основі нікотинаміду та холекальциферолу для супровідної терапії ЦД та його ускладнень, що сприятиме поліпшенню якості життя пацієнтів із цим захворюванням

**Метою роботи** є дослідження ролі нікотинаміду та холекальциферолу у регулюванні процесу полі-ADP-рибозилювання ядерних протеїнів та NF-kB-опосередкованих сигнальних шляхів у корекції метаболічних порушень за умов цукрового діабету.

**Завдання:**

1. Оцінити вплив нікотинаміду та холекальциферолу на життєздатність β-клітин підшлункової залози за умов in vivo та in vitro.
2. Дослідити цитопротекторну, антиоксидантну та протизапальну дію нікотинаміду та холекальциферолу за розвитку експериментального ЦД 1 типу.
3. Вивчити роль процесу полі-ADP-рибозилювання ядерних протеїнів у розвитку діабетичних ускладнень та коригувальний вплив на цей процес нікотинаміду та холекальциферолу.
4. Дослідити ефекти тривалого введення холекальциферолу на регулювання експресії протеїнів сигнального шляху RANKL/OPG та NF-κB за умов цукрового діабету.

# Результати: Згідно з поставленими завданнями були отримані наступні результати:

1. **Робота:** Кучмеровська Т.М., Донченко Г.В., Тихоненко Т.М., Гузик М.М., Яніцька Л.В., Степаненко С.П., Клименко А.П. Вплив нікотинаміду на функціональний стан острівцевих клітин підшлункової залози // Укр. біохім. журн. – 2012. - 84, № 2. – С. 81-88.

У роботі досліджено модулюючий вплив нікотинаміду (NAm) в різних концентраціях та за різної концентрації глюкози на життєздатність ізольованих клітин острівців Лангерганса підшлункової залози щурів і на окислювальний стрес індукований стрептозотоцином (СТЗ, 5 ммоль/л) та гідроген пероксидом (Н2О2, 100 мкмоль/л*) in vitro.* Встановлено, що інкубування ізольованих острівцевих клітин підшлункової залози із СТЗ та Н2О2 протягом 24 годин призводило до значної їх загибелі. Виявлено, що NАm в концентрації 5 ммоль/л не тільки проявляв цитопротекторну дію та тлі дії СТЗ та Н2О2, але й в однаковій мірі частково знижував рівень окислювального стресу в острівцевих клітинах підшлункової залози, індукованого цими сполуками. За високої концентрації NAm, 35 ммоль/л, він проявляв цитотоксичну дію на клітини підшлункової залози та викликав значну інтенсифікацію окислювального стресу на тлі дії СТЗ та Н2О2.

1. **Робота:** Гузик М.М., Дякун К.О., Яніцька Л.В., Кучмеровська Т.М. Вплив інгібіторів полі(ADP-рибозо)полімерази на деякі показники оксидативного стресу в лейкоцитах крові за стрептозотоцинового діабету у щурів // Укр. біохім. журн. – 2013. – 85, №1. – С. 62-70.

У роботі досліджено вплив специфічних інгібіторів полі(ADP-рибозо)полімерази-1 (PARP-1), зокрема нікотинаміду та 1,5- ізохіноліндіолу на лейкоцити крові в умовах цукрового діабету. Встановлено, що розвиток ЦД, індукованого стрептозотоцином, супроводжується інтенсифікацією окислювального стресу та значним зниженням життєздатності лейкоцитів порівняно з контрольною групою тварин. Введення інгібіторів PARP-1 запобігало розвитку окислювального стресу в лейкоцитах та підвищувало їх життєздатність. Виявлено зниження активності супероксиддисмутази в сироватці крові за ЦД. Досліджувані інгібітори PARP-1 не впливали на активність супероксиддисмутази та на рівень глюкози в крові. Одержані дані свідчать про інтенсифікацію окислювального стресу в лейкоцитах тварин з ЦД і здатність нікотинаміду та 1,5-ізохіноліндіолу запобігати його розвитку.

1. **Робота:** Гуріна Н.М., Шупрович А.А., Корпачева-Зінич О.В., Ховака В.В., Пентек Ю.Т., Гузик М.М., Дякун К.О., Кучмеровська Т.М. Стан обміну сечової кислоти та зміни рівня NAD+ у тканинах щурів за умов інсулінорезистентного синдрому, індукованого фруктозою  // Ендокринологія. – 2013. - 18, № 2. – С. 11-17.

Метою роботи було вивчення взаємозв’язків між розвитком гіперурикемії та вмістом NAD+ у різних тканинах щурів за умов експериментального інсулінорезистентному синдромі, індукованого фруктозною дієтою. Виявлено, що в щурів після 8 тижнів вживання 10% розчину фруктози в якості питної води розвиток інсулінорезистентності та гіперурикемії супроводжується зниженням рівня NAD+, яке є найвиразнішим у тканині печінки порівняно з нирками, серцем і мозком. Зниження рівня NAD+ у печінці, як і підвищення концентрації сечової кислои у сироватці крові та зниження активності Na+,K+-ATPази в синаптосомах мозку, виразніше в самців, тоді як самиці виявилися стійкішими до цих змін.

1. **Робота:** Кучмеровська Т.М., Пентек Ю.Т., Донченко Г.В., Янiцька Л.В., Гузик М.М., Дякун К.О. Окиснювальний стрес у серцi щурiв при експериментальному цукровому дiабетi: ефект нiкотинамiду // Доповiдi Нацiональної академiї наук України. – 2013. - № 8. – С. 176-181.

Метою дослiдження було з’ясувати стан окиснювального стресу в тканинi серця щурiв при ЦБ та можливiсть його корекцiї нiкотинамiдом. Було показано, що у щурів хворих на цукровий діабет маса тіла була в 2,5 рази нижче, а концентрація глюкози в крові вище у 5 разів у порівнянні з групою контролю. Введення нікотинаміду (NАm, 100 мг/кг) діабетичним щурам у незначній мірі знижувало рівень глюкози крові та не впливало на масу тіла. На тлі гіперглікемії збільшувався вміст TБК-активних продуктів в сироватці крові та серці. За хронічного введення NAm знижувався вміст TБК-активних продуктів як у сироватці крові, так і в серці, а також знижена за діабету активність супероксиддисмутази в серці частково відновлювалася. Таким чином, нікотинамід може знайти застосування у лікуванні діабетичної кардіоміопатії.

1. **Робота:** Guzyk M.M., Sergiichuk Iu.T., Dyakun K.O., Yanitska L.V., Kuchmerovska T.M. Effect of nicotinamide on amino acids content in bone collagen depending on biological availability of vitamins in diabetic rats // Ukr. Biochem. J. – 2014. – 86, №4. – P. 138-149.

У роботі протестована здатність нікотинаміду (NАm) впливати на амінокислотний склад колагену і на доступність вітамінів за діабету. Через 4 тижні після індукції стрептозотоцинового діабету (СТ З, 60 мг/кг маси тіла) щурам-самцям лінії Wistar протягом 2 тижнів вводили NАm (200 мг/кг маси тіла. У щурів за діабету виявлені зміни амінокислотного складуколагену I типу, головним чином значне зниження вмісту залишків o-Pro, Gly, Ala, o-Lys та Pro та збільшення вмісту залишків Lys, His, Arg, Glu Thr, Leu, Phе (*Р* < 0,05). Введення NАm частково нормалізувало амінокислотний склад колагену. Вміст вітамінів С та В3 у крові та печінці щурів з діабетом був значно знижений, тоді як рівень α-токоферолу був підвищений у порівнянні з контролем (*Р* < 0,05). Введення NAm діабетичним щурам нормалізувало вміст вітамінів С та В3 у крові та печінці. Одержані дані свідчать про функціональний зв’язок між асоційованими з діабетом змінами в амінокислотному складі колагену та забезпеченості вітамінами, які необхідні для його синтезу. Таким чином, нікотинамід може знайти застосування при лікуванні порушень метаболізму в кістках, індукованих цукровим діабетом.

1. **Робота:** Сергійчук Ю.Т., Тихоненко Т. М., Гузик М. М., Яніцька Л. В., Кучмеровська Т. М. 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. – С. 41-52.

Було досліджено ефект сумісного введення досліджуваних сполук (ДС), а саме нікотинаміду, ацетил-L-карнітину та α-ліпоєвої кислоти, на окремі ланки вуглеводного обміну в печінці, мозку та серці щурів за експериментального ЦД 2 типу. Сумісне введення нікотинаміду, ацетил-L-карнітину та α-ліпоєвої кислоти призводило до часткового зниження рівня гіперглікемії у щу­рів. За дії досліджуваних сполук активності гексокінази та глюкокінази, які були знижені за діабету на 62 і 84 % відповідно порівняно з контролем частково нор­малізувалися. Вміст NAD у мозку, серці та печінці щурів, хворих на діабет, знижу­вався на 46, 52 і 36 %, а введення ДС його підвищувало, особливо в печінці. Ви­явлено, що співвідношення вільних NAD/NADH і NADP/NADPH пар за діабету були знижені в мозку, печінці та серці порівняно з контролем. Редокс-стан у цих ткани­нах помітно нормалізувався за дії досліджуваних сполук. За діабету концентрація амінокислот у сироватці крові щурів змінювалася і частково нормалізувалася за дії досліджуваних сполук.

1. **Робота:** Лабудзинский Д.О., Лисаковская О.А., Шиманский И.А., Рясный В.М., Великий Н.Н. Роль витамина D3 в регуляции минерального обмена при экспериментальном сахарном диабете 1 типа // Биомедицинская химия. – 2014 – Т. 60, № 5. – С.567-575.

Показано, що за експериментального стрептозотоцинового діабету 1 типу у мишей виникає значний дефіцит вітаміну D3, що детектується по зниженню рівня 25OHD3 у сироватці крові. Недостатність вітаміну D3 корелювала з порушеннями мінерального обміну у кістковій тканині, що свідчить про розвиток вторинного остеопорозу. Спостерігалося зменшення маси, довжини та діаметру (діафіза, проксимального метаепіфіза) великої гомілкової кістки у тварин із діабетом у порівнянні з контрольними. У сироватці крові за ЦД була виявлена ​​виражена гіпокальціємія і гіпофосфатемія, а також підвищення ферментативної активності лужної фосфотази та її ізоферментів. Актуальним було дослідити потенційні механізми порушення метаболізму вітаміну D3 при виникненні вторинного остеопорозу за експериментального ЦД спираючись на функціонування вітамін D3 25-гідроксилази CYP27A1 і CYP2R1, а так само на зв'язок із посилюванням резорбції кісткової тканини. Продемонстровано порушення експресії ізоформ вітамін D3 25-гідроксилази CYP27A1 і CYP2R1, які є основними ферментами біотрансформації холекальциферола у 25OHD3 – попередника гормонально активних форм вітаміну D3. Введення вітаміну D3 обумовлювало нормалізацію рівня 25OHD3 у сироватці крові, що супроводжувалося значним поліпшенням стану мінерального обміну у порівнянні з групою діабету. Про зменшення процесів кісткової резорбції судили по нормалізації концентрації загального, ультрафільтраційного кальцію і неорганічного фосфату, зменшенню активності лужної фосфотаза у сироватці крови, а також збільшенню маси, довжини, діаметру (діафіза, проксимального епіметафіза) великої гомілкової кістки у діабетичних тварин, яким вводився холекальциферол. Також були відзначені позитивні зміни у експресії ізоформ вітамін D3 25-гідроксилази CYP27A1 і CYP2R1. Таким чином, порушення мінерального обміну при експериментальному цукровому діабеті у мишей визначаються дефіцитом вітаміну D3 і його гормонально активних форм.

1. **Робота:** Сергійчук Ю.Т., Конопельнюк В.В., Тихоненко Т.М., Кучмеровська Т.М. Корекція окремих ланок обміну серотоніну за експериментального цукрового діабету 2 типу // Ендокринологія. – 2014. – 19, № 3. – С. 210-216.

Досліджено сумісний вплив нікотинаміду, ацетил-L-карнітину та α-ліпоєвої кислоти на стан окремих ланок обміну серотоніну та рівень NAD у головному мозку щурів з експериментальним цукровим діабетом 2 типу. На тлі розвитку інсулінорезистентності за цукрового діабету спостерігалося зростання вмісту глюкози та глікозильованого гемоглобіну в крові в 1,8 та 2 рази відповідно. При цьому вміст NAD у мозку щурів знижувався на 44% порівняно з контролем. За умов цукрового діабету вміст триптофану та серотоніну в крові знижувався на 40% та 45%, а в мозку – на 62% та 53% відповідно. Сумісне введення досліджуваних сполук викликало зниження вмісту глюкози та глікозильованого гемоглобіну відповідно в 1,4 та 1,7 рази порівняно з показниками щурів із ЦД 2 типу. Також встановлено нормалізацію вмісту серотоніну в крові та підвищення його вмісту в мозку на 46%, зростання вмісту триптофану в крові та мозку відповідно на 51% та 47% порівняно з показниками щурів з експериментальним цукровим діабетом 2 типу. Активність триптофан-гідроксилази за цукрового діабету підвищувалася на 20% порівняно з контролем та частково знижувалася при сумісному введенні нікотинаміду, ацетил-L-карнітину та α-ліпоєвої кислоти. Таким чином, сумісне введення цих сполук може знайти застосування для корекції порушень функціонування ключових ланок обміну серотоніну в мозку за цукрового діабету 2 типу.

1. **Робота:** Лабудзинський Д.О., Шиманський І.О., Рясний В.М., Великий М.М. Забезпеченість організму вітаміном D3 та функціональна активність фагоцитуючих клітин периферичної крові за експериментального цукрового діабету 1 типу // Укр. біохім. журнал. – 2014 – Т. 86, № 2. – С. 107-118.

Дослідженняприсвячено встановленню взаємозв`язку між рівнем забезпеченості організму вітаміном D3, вмістом ізоензимів вітамін D3 25-гідроксилази CYP27A1 і CYP2R1 у тканині печінки та функціональною активністю фагоцитів периферичної крові мишей за експериментального цукрового діабету 1-го типу. Показано, що цукровий діабет супроводжується розвитком вітамін D3-дефіцитного стану, який характеризується зниженням вмісту 25ОНD3 у сироватці крові та обумовлений зміною експресії основних ізоформ вітамін D3 25-гідроксилази гепатоцитів: рівень синтезу CYP27A1 істотно знижується, а CYP2R1 зростає. Виявлено нормалізацію тканинного рівня обох ізоформ та вмісту 25ОНD3 у разі введення холекальциферолу. Недостатня забезпеченість організму тварин вітаміном D3 за цукрового діабету корелює зі зниженням фагоцитарної активності гранулоцитів і моноцитів та здатності їх продукувати бактерицидні біооксиданти (активні форми кисню та азоту). Продемонстровано імунорегуляторну роль холекальциферолу в забезпеченні механізму фагоцитарної елімінації антигенів гранулоцитами і моноцитами крові.

1. **Робота:** Леонов Ю.І., Шкумат М.С., Клименко П.П., Говорун М.Ю., Гузик М.М., Кучмеровська Т.М., Пішель І.М. Вплив експресії гена, що кодує інсуліноподібний фактор росту IGF-1 на загоєння ран шкіри у мишей зі стрептозотоцин-індукованим діабетом // Цитология и генетика. – 2015. – 49, № 1. – С. 26-34.

Проведено морфологічне та молекулярно-біологічне дослідження ран шкіри мишей лінії FVB дикого типу та трансгенних тварин K14/mIGF-1 зі стрептозотоцин-індукованим діабетом. Показано збільшення експресії IGF-1, площі та товщини регенеруючого епітелію, кількості клітин Mac-1+ в рані у трансгенних тварин порівняно з диким типом.

1. **Робота:** Labudzynskyi D.O., Zaitseva O.V., Latyshko N.V., Gudkova O.O., Veliky M.M. Vitamin D3 contribution to the regulation of oxidative metabolism in the liver of diabetic mice // Ukr. Biochem. J. – 2015. – 87 (3). – Р.: 75-90.

Робота присвячена вивченню особливостей окисного метаболізму гепатоцитів мишей за цукрового діабету та дії вітаміну D3. Встановлено, що хронічна гіперглікемія за цукрового діабету зумовлює зниження у 2,5 раза вмісту 25ОН D3 у сироватці крові та компенсаторне зростання вітамін D3 25-гідроксилазної активності гепатоцитів. Розвиток вітамін D3 дефіцитного стану супроводжується інтенсифікацією продукції активних форм кисню (АФК) та монооксиду азоту (NO), окисної модифікації протеїнів (за вмістом карбонільних груп та 3-нітротирозину), накопиченням дієнових кон’югатів та ТБК -активних продуктів пероксидації ліпідів і зниженням рівня вільних SH-груп низькомолекулярних сполук у печінці. Показано зниження активності ключових ензимів системи антиоксидантного захисту (каталази, СОД), водночас як активність прооксидантних ензимів NAD(P)H:хінон-оксидоредуктази, ксантиноксидази і NAD(P)Hоксидази зростала. Виявлені порушення окисного метаболізму обумовили посилення процесу некротичної загибелі гепатоцитів, тестованої за здатностю їхніх ядер до накопичення пропідію йодиду. Тривале введення (протягом 2 місяців) вітаміну D3 у дозі 20 МО тваринам із цукровим діабетом супроводжується зниженням рівня утворення АФК та окисного ушкодження біомолекул, нормалізує стан системи антиоксидантного захисту в печінці та підвищує виживання гепатоцитів. Результати роботи свідчать про залучення вітаміну D3 у регулюванні окисного метаболізму за цукрового діабету.

1. **Робота:** Lamazyan G. R., Guzyk M. M., Kuchmerovska T. M. Influence of Citrullus Colocynthis (l.) Shrad dry fruits extract on pancreas β-cells viability // Ukrainian biopharmaceutical journal. – 2016. – №2 (43). – P. 35-39.

Досліджено здатність екстракту сухих плодів Citrullus colocynthis впливати на виживання клітин RIN-m5F in vitro. Різні концентрації Citrullus colocynthis не чинили токсичної дії на життєздатність β-клітин. Вплив на β-клітини високої концентрації глюкози і прооксидантних агентів, таких як трет-бутилгідропероксид і олеїнова кислота викликав цитотоксичну дію на їх життєздатність.

1. **Робота:** Тихоненко Т., Дякун К., Сергійчук Ю. Мітохондріальна дегідрогеназна активність нервових закінчень мозку щурів // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2016. – Випуск 73. – С. 203-207.

Досліджено вплив вітаміну В3 та стрептозотоцину за їх різних концентрацій на мітохондріальну дегідрогеназну активність ізольованих мітохондрій нервових закінчень мозку щурів лінії Wistar. Виявлено, що мітохон­дріальна дегідрогеназна активність підвищується за дії стрептозотоцину порівняно з показниками контролю, причому його вплив був дозозалежним. Встановлено, що вітамін В3 проявляв цитопротекторну дію на мітохондрії нервових закінчень, яка була більш виражена до внесення СТЗ, ніж після. Тобто нами було встановлено, що протекторна дія вітаміну В3 може реалізуватися шляхом його позитивного впливу на мітохондріальну дегідрогеназну активність за цитотоксичної дії стрептозотоцину, що, принаймні, частково буде призводити до нормалізації функціонування нервових закінчень мозку за даних експериментальних умов. Подальші дослідження при використанні більш широкого діапазону концентрацій NАm дозволять з’ясувати, при якій саме концентрації його вплив на мітохондріальну дегідрогеназну активність нервових закінчень мозку щурів буде найбільш ефективним, що сприятиме його застосуванню при дисфункціях мозку різного ґенезу.

1. **Робота:** Labudzynskyi D.O., Manoylov K.U., Shymanskyy I.O., Veliky M.M. Immunoregulatory effects of vitamin D3 in experimentally induced type 1 diabetes // Cytol. Genet. – 2016. – 50 (4). – Р.: 231-240.

Робота присвячена вивченню особливостей функціонування Т-клітинної ланки імунного захисту та гуморальної відповіді при штучній імунізації за експериментального цукрового діабету та при довготривалому введенні вітаміну D3. Встановлено, що хронічна гіперглікемія за цукрового діабету викликає зниження в 2,3 рази вмісту 25ОНD3 у сироватці - основного маркера-попередника гормонально активних форм вітаміну D3. Розвиток вітамін D3-дефіцитного стану супроводжується порушенням проліферативної активності Т-лімфоцитів, зміну співвідношення регуляторної (CD4+-позитивні лімфоцити) та цитотоксичної (CD8+-позитивні лімфоцити) субпопуляцій. У загальних лізатах Т-лімфоцитів селезінки відмічене зростання вмісту фосфорильованої субодиниці p65 ядерного фактору κB та посилення її транслокація до ядра. Окрім цього було показано інтенсифікацію гуморальної відповіді IgG на перитоніальне введення рекомбінантної субодиниці В дифтерійного токсину. Виявлені порушення клітинної ланки імунної системи супроводжуються посиленням процесів апоптичної загибелі спленоцитів, детектованої за здатністю мітки Annexin V-GFP зв`язуватися із фосфотидилсерином, який при апоптозі експонується на зовнішній стороні плазмалеми. Тривале введення (протягом 2-х місяців) вітаміну D3 у дозі 20 МО діабетичним тваринам сприяло нормалізації проліферативної активності та співвідношення Т-клітинних субпопуляцій, зменшенню вмісту фосфорильованої субодиниці NF-κB – p65 та збалансованій секреції IgG проти штучного антигену. Ці зміни супроводжувались зменшенням кількості апоптичних подій у цільній популяції спленоцитів. Результати роботи свідчать про вагому роль вітаміну D3 **у регулюванні функцій імунної системи за цукрового діабету 1 типу.**

1. **Робота:** Labudzynskyi D.O., Shymanskyy I.O., Veliky M.M. Role of vitamin D3 in regulation of interleukin-6 and osteopontin expression in liver of diabetic mice // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. – 2016. – 20 (13). – Р.: 2916-9.

Показано, що iндукцiя експресiї плюрипотентного прозапального iнтерлейкiну 6 (IL-6) у печiнцi на фонi цукрового дiабету супроводжується посиленням експресiї остеопонтину (OPN) — молекулярного регулятора синтезу прозапальних цитокiнiв. Змiни експресiї OPN та IL-6 корелюють зi значним дефiцитом вiтамiну D3 в органiзмi. Нормалiзацiя рiвня вiтамiну D3 приводить до iстотного зменшення рiвня експресiї мРНК як OPN, так i IL-6, що свiдчить про цитопротекторний вплив холекальциферолу у разi дiабет-iндукованих пошкоджень печiнки.

1. **Робота:** Guzyk M., Tykhomyrov A., Nedzvetsky V., Prischepa I., Grinenko T., Yanitska L., Kuchmerovska T. Poly (ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Inhibitors Reduce Reactive Gliosis and Improve Angiostatin Levels in Retina of Diabetic Rats // Neurochemical Research. – 2016. – Vol. 41, Issue 10. – Р.: 2526–2537. DOI: 10.1007/s11064-016-1964-3.

У роботі було досліджено процес полі-ADP-рибозилювання протеїнів за умов діабетичної ретинопатії та з’ясувано роль цього процесу у розвитку реактивного гліозу. Згідно проведених досліджень було виявлено підвищену фрагментацію ензиму PARP-1 та збільшення вмісту рибозильованих протеїнів в ізольованій сітківці ока. Введення інгібіторів PARP-1, призводило до нормалізації даного показника, а саме до зниження вмісту рибозильованих протеїнів, а також пригнічувало фрагментацію PARP-1. На тлі підвищеної активації, інтенсифікації ADP-рибозилювання, було виявлено також зміни на гліальних клітинах сітківки, а саме підвищення їх активації, що проявлялось у підвищенні вмісту специфічного компоненту їх цитоскелету – гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) у сітківка ока діабетичних щурів. Більше того, за даних умов, виявлено більш ніж трьохразове збільшення вмісту деградованих продуктів даного протеїну, що є свідченням розвитку реактивного гліозу. Введення інгібіторів PARP-1 призводило до значного зниження як загального протеїну так і попереджало обмежений протеоліз даного протеїну. Таким чином інгібітори PARP-1 можуть сприяти протекції ретиноглії, шляхом пригнічення активності PARP-1. Слід зауважити, що результати імуноблотингу знайшли своє підтвердження під час імуногістохімічного аналізу зрізів сітківки ока. Згідно представлених даних світлової та конфокальної мікроскопії було виявлено підвищену імунореактивність проти GFAP на зрізах сітківки діабетичних тварин та зменшення її інтенсивності за введення 3-АВ та NАm.

Таким чином, протекторні ефекти інгібіторів PARP-1, які мають місце у сітківці за діабету, можуть реалізовуватися через інгібування клітинної загибелі та нормалізацію функціональної активності ретиноглії, в результаті пригнічення процесів фрагментації ензиму PARP-1 та обмеженого протеолізу GFAP.

**Висновки:**

1. Показано, що за цукрового діабету 1 типу у лейкоцитах крові посилюється розвиток оксидативного стресу та знижується їх життєздатність. Ці зміни супроводжуються інтенсифікацією прозапальних процесів, зокрема зростанням вмісту цитокінів IFN-γ, IL-4, а також TNF-α у сироватці крові діабетичних щурів. Було продемонстровано, що NAm та вітамін D3 частково нормалізують рівень продукції АФК у лейкоцитах, та зменшують вміст прозапальних цитокінів у сироватці крові.
2. Встановлено, що введення діабетичним щурам NAm призводить до часткової нормалізації функцій інсулінпродукуючих β-клітин підшлункової залози піддослідних тварин. Гістологічні дослідження показали, що введення вітаміну D3 діабетичним тваринам сприяло зменшенню рівня деструктивних процесів у острівцях Лангерганса підшлункової залози та частковому відновленню їх функцій.
3. Продемонстровано цитопротекторну дію NAm у діапазоні концентрацій від 5,0 до 20,0 ммоль/л на життєздатність ізольованих клітин острівців Лангерганса підшлункової залози щурів за умов розвитку оксидативного стресу, індукованого стрептозотоцином (5,0 ммоль/л) та глюкозою у високих концентраціях.
4. На тлі підвищеної активності PARP-1 у ядрах клітин головного мозку діабетичних щурів виявлено збільшення вмісту полі-ADP-рибозильованих протеїнів та істотні зміни рівня експресії NAD-залежних деацетилаз пістонів: зниження рівня експресії SIRT1 та підвищення вмісту SIRT2.
5. Встановлено, що за тривалого введення NAm та холекальциферолу відбувається нормалізація підвищеного вмісту PARP-1, рівня рибозильованих протеїнів та продуктів розщеплення PARP-1 у тканинах печінки, мозку, серця та ретини за цукрового діабету.
6. Показано значне зростання вмісту фосфорильованої (активної) форми p65/NF-κB у ізольованих Т-лімфоцитах, кістковій тканині та у печінці за цукрового діабету 1 типу. У тканині печінки спостерігалася надекспресія NF-κB-опосередкованих прозапальних протеїнів VEGF, iNOS, а у кістковій тканині – зростання вмісту компонентів NF-κB-асоційованої сигнальної системи ремоделювання кісткової тканини RANKL і RANK та зниження вмісту OPG.
7. Продемонстровано майже 3-х разове зменшення вмісту маркеру забезпеченності вітаміном D3 у сироватці крові – 25ОНD3, що супроводжувалося зниженням вмісту протеїну-рецептору VDR у тканинах, та є свідченням розвитку вираженого дефіциту холекальциферолу за цукрового діабету. Введення терапевничних доз холекальциферолу відновлювало нормальний вміст 25ОНD3 у сироватці крові діабетичних тварин, а також мало значний нормалізуючий ефект на експресію NF-κB-опосередкованих регуляторних протеїнів.
8. Введення терапетичних доз NАm та холекальциферолу за експериментального цукрового діабету продемонструвало, що ці сполуки володіють протизапальною, антиоксидантною, імуномодуляторною та цитопротекторною дією. Отримані результати свідчать про плейотропність ефектів NАm та холекальциферолу в організмі діабетичних тварин та можуть слугувати підгрунтям для розробки комплексного препарату супровідної терапії цукрового діабету та його ускладнень (полінейропатій, ретинопатій, імунопатій, міопатій, вторинного остеопорозу тощо), що сприятиме поліпшенню якості життя пацієнтів, хворих на цукровий діабет.

**Наукова новизна одержаних результатів.**

У роботі вперше системно досліджено рівень процесів полі-ADP-рибозилювання протеїнів у тканинах різних органів за цукрового діабету 1 типу, їх зв'язок із іншими метаболічними процесами та експериментально обґрунтовано можливість ефективного застосування Nam, як ефективного інгібітора PARP-1, у корекції індукованих діабетом порушень. Вперше на моделі експериментального діабету 1 типу було виявлено органну специфічність процесу полі-ADP-рибозилювання протеїнів, перебіг якого за умов цукрового діабету типу залежить від інтенсивності розвитку оксидативного стресу, запальних процесів, стану системи антиоксидантного захисту. Встановлено, що найбільш виражені патологічні зміни відбуваються у мозку та сітківці ока діабетичних щурів. На тлі активації процесів полі-ADP-рибозилювання та зниженого вмісту NAD+ відбувається посилення фрагментації PARP-1 та зростання рівня NAD-залежної деацетилази SIRT2, що може характеризувати глибину розвитку нейродегенеративних змін у мозку. Показано, що пізні ускладнення діабету супроводжуються патологічними змінами в сітківці ока діабетичних щурів, які зумовлені структурною перебудовою протеїнів цитоскелету та неоваскуляризацією. Застосування досліджуваних інгібіторів PARP-1 призводило до часткової або повної нормалізації біохімічних та функціональних порушень, при цьому за ретинопатії ефект інгібіторів був найбільш вираженим. Вперше виявлено кореляцію між ступенем фрагментації PARP-1 та гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP), а також нормалізацію ангіогенезу за рахунок підвищення вмісту ангіостатинів у сітківці ока діабетичних щурів за дії інгібіторів. Також було продемонстровано нормалізуючий антиоксидантний вплив Nam на прозапальні процеси та вміст антиоксидантних ензимів у тканинах серця, мозку та печінки.

У роботах також було досліджено дію вітаміну D3 на цільові системи в організмі тварин із цукровим діабетом, з огляду на стан його забезпеченості в організмі. Зокрема, було показано діабет-індуковане зменшення вмісту його 25ОНD3 активного метаболіту у сироватці крові, що було зумовлено у тому числі порушеннями у функціонуванні 25-гідроксилазної системи печінки. Було виявлено, що на тлі важкого дефіциту вітаміну D3 в організмі за цукрового діабету спостерігалася інтенсифікація прооксидантних та прозапальних процесів у печінці та кістковій тканині. Було показано, що на цьому фоні спостерігалася активація NF-κB-асоційованих сигнальних шляхів та зростав ступінь експресії прозапальних регуляторних протеїнів у тканинах і цитокінів у сироватці крові. Продемонстровано, що введення терапевтичних доз холекальциферолу мало нормалізуючі ефекти на метаболічні процеси у кістках і печінці шляхом геномної регуляції, зокрема процесів полі- ADP-рибозилювання, та через функціонування активованих ланок імунної системи. Ілюстративним стало відкриття авторегуляторних ефектів холекальциферолу на вітамін D3-ендокринну систему печінки, зокрема на функціонування 25-гідроксилазної системи печінки.

Таким чином, важливо підкреслити, що у серії проведених досліджень з’ясовано молекулярні механізми коригувальної дії нікотинаміду та холекальциферолу за цукрового діабету та його ускладнень, які реалізуються шляхом їх плейотропної дії на досліджувані процеси в організмі, що сприяє розширенню розуміння механізмів дії цих вітамінів, а також патогенезу цукрового діабету та його ускладнень.

**Практичне значення одержаних результатів.** Новітні молекулярно-біологічні дослідження дають змогу ефективно з’ясовувати етіологію виникнення, механізми патогенезу цукрового діабету та його ускладнень, і як наслідок, дозволяють знаходити нові підходи у їх терапії.

Основним глобальним кроком у лікуванні будь-якого захворювання є з’ясування механізмів його патогенезу та умов виникнення. Сучасні уявлення про механізми виникнення та перебігу цукрового діабету поки що не надають достатньої можливості для розуміння та лікування цього захворювання.

Результати проведених досліджень дозволяють наблизитися до з’ясування та розуміння ряду молекулярних механізмів патогенезу цукрового діабету: особливостей функціонування процесу полі-ADP-рибозилювання та інших NADH-залежних процесів, NF-κB-асоційованих сигнальних шляхів, прозапальних процесів, імунних реакцій та вітамін D-ендокринної системи. Ключовим моментом наших досліджень стала можливість корекції діабет-опосередкованих порушень вищезазначених процесів за допомогою нікотинаміду і холекальциферолу. Було продемонстровано їх виражені антиоксидантну, протизапальну, цитопротекторну, імуномодуляторну та остеотропну дію у різних тканинах за цукрового діабету.

Слід зазначити, що отримані результати проведених досліджень мають важливе потенційне значення для медицини, фармакології та токсикології, оскільки розширюють та поглиблюють сучасні уявлення про низку механізмів патогенезу цукрового діабету і шляхів їх корекції. Результати проведених досліджень сприятимуть пошуку нових підходів корекції виявлених порушень у досліджуваних об’єктах з використанням інгібіторів PARP-1 та геномних регуляторів у комплексній діагностиці, профілактиці та лікуванні цукрового діабету.

Підсумовуючи вищезазначене, можна стверджувати, що ці дослідження є першим щаблем у розробці та створенні комбінованого препарату широкого спектру корегувальної дії, на основі нікотинаміду та холекальциферолу, який може бути більш ефективним у профілактиці та супровідній терапії при лікуванні цукрового діабету та його ускладнень, що сприятиме покращенню якості життя хворих із цим захворюванням.

**Загальна кількість публікацій**. Цикл робіт включає 16 статей (з них 5 в «Українському біохімічному журналі», 2 - в журналі «Ендокринологія», 1 - в «Біологічні. Студії», 1 – «Доповіді Національної академії наук України, 1- Биомедицинская химия, 2 - Цитология и генетика, 1 - Ukrainian biopharmaceutical journal, 1 - Вісник Львівського університету. Серія біологічна, 1 - Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci, 1 - Neurochemical Research.

Загальна кількість публікацій 27. Загальна кількість посилань на публікацій авторів (згідно бази даних SCOPUS)=6,  h-індекс=2.

Виконавці:

к.б.н., н.с. Гузик М.М.

м.н.с. Лабудзинський Д.О.

асп. Тихоненко Т.М.

Вчений секретар

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна

к.б.н. З.С. Протасова