

М. М. ГУЗИК<sup>1</sup>, К. О. ДЯКУН<sup>2</sup>, Л. В. ЯНІЦЬКА<sup>3</sup>, І. Б. ПРИВРОЦЬКА<sup>4</sup>,  
І. Я. КРИНИЦЬКА<sup>4</sup>, І. М. ПШЕЛЬ<sup>5</sup>, Т. М. КУЧМЕРОВСЬКА<sup>1</sup>

## ІНГІБІТОРИ ПОЛІ(ADP-РИБОЗО)ПОЛІМЕРАЗИ-1 ЯК АГЕНТИ, ЩО ЗАБЕЗПЕЧУЮТЬ КОРЕКЦІЮ ДИСФУНКЦІЙ МОЗКУ, ІНДУКОВАНИХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

Надійшла 02.02.16

Досліджено вплив інгібіторів полі-ADP-рибозополімерази-1 (PARP-1) – 1,5-ізохіноліндіолу (ISO) та нікотинаміду (NAM) – на запальні процеси та активацію PARP-1 в умовах розвитку експериментальної діабетичної нейропатії – ДН (ускладнення стрептозотоциндукованого діабету 1-го типу) у щурів. Вміст IL-4 у сироватці крові в разі ДН був вищим на 50%, а вміст моноцитарно-хемотаксичного протеїну-1 – на 90 % у порівнянні з контролем. Збільшувався також вміст гамма-інтерферону, у той час як вміст гранулоцитарно-макрофагального колоніестимулюючого фактора не змінювався. На тлі активації PARP-1 та зниження вмісту субстрату цього ензиму – нікотинамідаденіндинуклеотиду (NAD) – у мозку посилювалася фрагментація PARP-1, на що вказувало збільшення в екстрактах тканин ядер мозку співвідношення вмістів в фрагменту 89 кДа та цільних молекул ензиму. Два досліджених структурно відмінних інгібітора PARP-1 при розвитку ДН частково або повністю нормалізували вимірювані показники. Як свідчать отримані результати, PARP-1 є однією із основних функціональних мішеней, через яку реалізується дія ISO та NAM. Окрім того, спектр дії даних інгібіторів є ширшим; зокрема, вони впливають на рівень прозапальних цитокінів. Здатність досліджуваних інгібіторів PARP-1 запобігати загибелі клітин мозку завдяки пригніченню активації та фрагментації вказаного ензиму свідчить про можливість інших їх ефектів на молекулярному рівні – сприяння підтриманню цілісності геному в нервових структурах мозку в умовах ДН та запобігання розвитку запальних процесів. Отже, досліджені інгібітори можуть знайти застосування для лікування дисфункцій мозку в разі цукрового діабету 1-го типу.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** цукровий діабет (ЦД) 1-го типу, діабетична нейропатія (ДН), інгібітори PARP-1, 1,5-ізохіноліндіол, нікотинамід, цитокіни, активація PARP-1.

### ВСТУП

Цукровий діабет (ЦД) є одним із тяжких ендокринних захворювань. Серед його ускладнень найбільш поширеною та обтяжуючою є діабетична нейропатія (ДН). Розвиток цієї патології призво-

дить до істотної інвалідазації або навіть смерті пацієнтів [1], а лікування відповідних розладів є досить складним та витратним. На даний час поширеність ДН серед хворих на ЦД 1-го та 2-го типів становить 65–70 % [2]. Вважають, що основними безпосередніми причинами розвитку та прогресування ДН є тривала гіперглікемія та пов'язані з нею порушення багатьох метаболічних процесів, зокрема інтенсифікація оксидативно-нітрозативного стресу, накопичення кінцевих продуктів посиленого глікування, негативні зміни у вуглеводному та ліпідному обміні тощо [3].

Незважаючи на те, що основним і найбільш частим ускладненням ЦД є периферична ДН, розвиток ЦД звичайно зумовлює патологічні зміни і в

<sup>1</sup> Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ (Україна).

<sup>2</sup> ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету ім. Тараса Шевченка (Україна).

<sup>3</sup> Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця МОЗ України, Київ (Україна).

<sup>4</sup> ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України» (Україна).

<sup>5</sup> Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України, Київ (Україна).

Ел. пошта: tkuchmerovska@gmail.com (Т. М. Кучмеровська).

ЦНС, і це супроводжується низькою дисфункцією мозку. Довготривалі нейрофізіологічні порушення, пов'язані з ДН, проявляються на фізіологічному, метаболічному, структурному та молекулярному рівнях. Це призводить до функціональних і структурних змін у відділах мозку, відповідальних за пам'ять, розумові здатності та емоційну поведінку. Очевидно, що подібна ситуація зумовлює істотні негативні соціальні наслідки.

На даний час запропоновано відносно широкий спектр фармакологічних засобів для симптоматичного лікування периферичної ДН та енцефалопатії [4]. Так, досліджуються та проходять клінічні випробування ряд нових препаратів, зокрема ацетил-L-карнітин, альфа-ліпоева кислота, інгібітори протеїнкінази С (рубоксистерин) та альдозоредуктази (фідарестат), агенти, що впливають на кінцеві продукти посиленого глікування (аміногуанідин) та гексозаміновий шлях (бенфотіамін), інгібітори ангіотензинперетворюючого ензиму (трандолаприл), а також інгібітори полі-ADP-рибозополімерази-1 (PARP-1), зокрема нікотинамід (NAm). Більшість із цих препаратів можуть діяти одночасно за декількома механізмами. Так, для NAm є характерним широкий спектр дії; зазначений агент впливає на нейромедіаторні системи, зокрема серотонінергічну, та на функціонування натрій-калієвої помпи. Ми виявили такі його ефекти в мозку щурів в умовах розвитку ЦД-1 [5]. Незважаючи на встановлену цитопротекторну дію NAm, який запобігає розвитку ЦД та пригнічує його перебіг завдяки відновленню функцій бета-клітин підшлункової залози, ефективність даного агента як інгібітора PARP-1, а також ефективність інших інгібіторів ензимів в умовах розвитку ДН остаточно не з'ясовані [6]. Зрозуміло, що без ідентифікації всіх можливих механізмів реалізації дії інгібіторів PARP-1 найбільш ефективний препарат для лікування конкретного випадку ДН (енцефалопатія, автономна чи периферична нейропатія) підібрати досить важко. Це спонукає до пошуку певних ефективних препаратів спрямованої дії. Більше того, з'ясування впливу інгібіторів PARP-1 на розвиток ДН є також важливим не тільки для глибшого розуміння механізмів їх дії, але й для ідентифікації конкретних механізмів, які лежать в основі розвитку ДН. Такі механізми все ще залишаються повністю не дослідженими.

Як відомо, хронічна гіперглікемія супроводжується істотними фізіологічними, біохімічними та гістологічними змінами у пацієнтів, що стражда-

ють на ЦД. Такі зрушення призводять до розвитку дисфункцій ендотелію. Це, в свою чергу, є причиною зниження інтенсивності кровообігу та розвитку внутрішньонервової та внутрішньоклітинної гіпоксії. Стан генералізованої гіпоксії посилює розвиток патофізіологічних та морфологічних змін у клітинах мозку в умовах ДН [7]. У подібній ситуації відбуваються зміни ендотелію судин, котрі забезпечують кровопостачання нервів. При цьому задіюються інші важливі молекулярні механізми, зокрема розвиваються стрес ендоплазматичного ретикулума та посилене фосфорилування мітогенактивованих кіназ (MAPK) [8], активуються PARP-1 та низка інших ензимів [5]. У цьому разі також можуть розвиватися запальні процеси – патологічні події, котрі спонукають тканини швидко реагувати на подібні зміни. Це призводить до залучення в процес клітин різних типів, в яких у відповідь на дію відповідних факторів може порушуватися регуляція експресії певних генів.

Ми досліджували метаболічні шляхи, котрі опосередковують дію інгібіторів PARP-1 – NAm та 1,5-ізохіноліндіолу (ISO) – в умовах розвитку церебральних дисфункцій, індукованих експериментальним ЦД 1-го типу.

## МЕТОДИКА

*Моделювання експериментального ЦД 1-го типу та схема введення інгібіторів PARP-1.* Експериментальний ЦД 1-го типу у щурів-самців лінії Wistar з масою тіла 125–150 г, яких утримували у звичайних умовах віварію з вільним доступом до їжі та води, індукували за допомогою одноразового внутрішньоочеревинного (в.о.) введення стрептозотозину (СТЗ; «Sigma», США) у дозі 70 мг/кг маси тіла. СТЗ розводили у цитратному буфері (0.1 М, рН 4.5) [9]. Щурам контрольної групи вводили лише цитратний буфер в аналогічному об'ємі. Щурам групи СТЗ після 10 тижнів розвитку діабету протягом 14 діб вводили в.о. ISO («Sigma», США) або NAm («Sigma», США) у дозах 3 та 100 мг/кг відповідно. Забір крові у тварин здійснювали вранці після 12-годинного голодування із ретробульбарного венозного синуса ока; маніпуляції виконували під легким ефірним наркозом. Рівень глюкози в крові визначали за допомогою глюкометра Precision Xtra Plus («MediSense UK Ltd.», Велика Британія). У дослідженнях використовували

ли щурів з вираженим діабетом (рівень глюкози в крові вище 17 мМ).

*Визначення вмісту цитокінів у сироватці крові тварин.* Вміст цитокінів у сироватці крові досліджуваних щурів визначали із застосуванням мультиплексного набору Rat Cytokines bplex FlowCytomix Multiplex («eBioscience», США) на протоковому цитофлуориметрі Coulter Epics XL («Beckman Coulter», США), оснащеному аргонним лазером ( $\lambda_{\text{збудж.}} = 488 \text{ нм}$ ). Використаний набір вміщує сферичні частки різного діаметра зі специфічними антитілами щодо GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1  $\alpha$ , IL-4, MCP-1 та TNF- $\alpha$ . Обробку результатів проводили за допомогою програми FCS Express V3 («De Novo Software», США).

*Визначення вмісту нікотинамідаденіндинуклеотиду (NAD) у тканині мозку щурів.* Рівень NAD у мозку щурів визначали у депротейнізованих кислотних екстрактах тканини мозку згідно з методом, який ґрунтується на відновленні NAD за участі алкогольдегідрогенази. Враховували коефіцієнт молярної екстинції, який становить  $6.22 \text{ см}^2/\text{мкмоль}$  при довжині хвилі 340 нм [10].

*Визначення вмісту протеїнів у досліджуваних зразках.* Вміст протеїнів визначали за поглинанням в УФ-ділянці спектра за допомогою спектрофотометра СФ-2000-02 (ОКБ «Спектр», РФ) згідно з описаним методом [11], а також за методом Бредфорд [12].

*Визначення активності PARP-1 в ядрах мозку тварин.* Активність PARP-1 в ядрах мозку оцінювали за кількістю радіоактивно міченого ADP-рибозного фрагмента [ $U\text{-}^{14}\text{C}$ ] NAD («Amersham», Велика Британія), включеного до загальних ядерних протеїнів клітин головного мозку щурів. Використовувалася методика Танігава та співавт. [13]; застосовували фільтри «Whatman» GF/C. Активність ензиму оцінювали як кількість ADP-рибозного фрагмента [ $U\text{-}^{14}\text{C}$ ] NAD (пмоль), зв'язаного з ядерними протеїнами мозку щурів. Виміри кількості зв'язаної радіоактивності протягом 1 хв на 1 мг протеїну ядер виконували за допомогою рідинного сцинтиляційного лічильника (SL-30 «Intertechnique», Франція).

*Фракціонування та отримання ядерних протеїнів мозку.* До 100 мг розтертої в рідкому азоті тканини мозку щурів додавали 0.5 %-вий розчин NP40-PBS із сумішшю інгібіторів протеаз та фосфатаз («Thermo Scientific», США) для лізису клітинних мембран; гомогенат перемішували

при  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$  протягом 20 хв [14]. Ядра осаджували за допомогою центрифугування ( $14000g$ ) протягом 20 хв. До осаду ядер додавали лізуючий буфер RIPA такого складу: 20 мМ Tris-HCl (pH 7.6), 1 % Triton-X100, 150 мМ NaCl, 50 мМ NaF та 0.2 % додецилсульфату натрію (ДСН) і перемішували при  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$  протягом 5 хв. Буфер вміщував суміш інгібіторів протеаз («Thermo Scientific», США). Ядерні мембрани руйнували ультразвуком з використанням іонізатора Lab Sonic M («Sartorius», ФРН). Процедура проводили два рази (Cycle 0.8, Ampl. 50 %, тривалість по 20 с). Ядерні мембрани видаляли за допомогою центрифугування ( $14000g$  при  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) протягом 20 хв. До інтерфази (ядерна фракція протеїнів) додавали 20 % буфера Леммлі та прогрівали проби при  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  протягом 5 хв. До використання зразки зберігали замороженими ( $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

*Електрофорез протеїнів у поліакриламідному гелі (ПААГ).* Електрофорез протеїнів проводили у 8–10 %-вому ПААГ за присутності 0.1 % ДСН протягом 3–4 год, використовуючи камеру для електрофорезу Mini-PROTEAN II («BIO-RAD», Швеція) [15] для подальшого імуноблот-аналізу. Молекулярну масу протеїнів на електрофореграмах визначали із застосуванням стандартів протеїнів фірм «Thermo Scientific» (США) та «Fermentas» (Литва).

*Імуноблот-аналіз протеїнів.* Блотинг протеїнів із ПААГ на нітроцелюлозну мембрану («GE Healthcare», Велика Британія) проводили в апараті Mini Trans-Blot Cell («BIO-RAD», Швеція) при напрузі 100 В протягом 90 хв. По закінченню мембрани забарвлювали протягом 5–10 хв 1 %-вим розчином барвника Ponceau S, приготвленим на 3 %-вому розчині трихлороцтової кислоти. Надалі вільні центри зв'язування на мембрані блокували протягом 1 год 5 %-вим розчином сухого знежиреного молока («APEX Research», США) в буфері PBS із додаванням 0.1 % Tween-20 у фосфатному буфері (PBSt). У подальшому мембрану інкубували протягом ночі з первинними антитілами в буфері для блокування при  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$  з наступним промиванням PBSt (тричі по 5 хв). Як вторинні антитіла використовували антимишачі або антикролячі IgG, кон'юговані з пероксидазою хрому, в розведенні в буфері для блокування 1:10000 та 1:1000, відповідно. Інкубацію з вторинними антитілами проводили протягом 1 год при кімнатній температурі, після чого мембрану тричі по 5 хв відмивали PBSt. У роботі було використано наступні антитіла: анти-

Poly(ADP-ribose) («Trevigen», США), анти-Insulin («Millipore», США), анти- $\beta$ -Actin-Peroxidase («Sigma», США), анти-Lamin B1 («Abcam», Велика Британія), анти-PARP («Cell Signaling Technology», США), анти-mouse IgG («Sigma», США) та анти-rabbit IgG («Sigma», США). Імунореактивні зони виявляли за допомогою вимірювання інтенсивності хемілюмінесценції [16]. Денситометричний аналіз проводили із застосуванням програмного забезпечення TotalLab TL120 («Nonlinear Inc.», США). Вміст протеїну представлено нижче в умовних одиницях (ум. од.).

Оцінка експресії мРНК PARP-1 у тканині мозку щурів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). При використанні ПЛР із зворотною транскрипцією (ЗТ) із 100 мг подрібненої тканини мозку отримували сумарний зразок РНК за допомогою набору реагентів Trizol («Isogene», РФ) згідно з протоколом виробника. Комплементарну ДНК (кДНК) отримували згідно з опублікованим методом [17] за допомогою набору «QuantiTect Reverse Transcription» («QIAGEN», ФРН). Отриману кДНК використовували для проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції за відповідним методом [18]. Для ампліфікації мРНК PARP-1 використовували праймери – прямий (5'-AAGGTCAAGAAGACCGCAGA-3') та зворотний (5'-AGAGGAGGCTAAAGCCCTTG-3'). Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовностям 312-331 та 624-605 у кДНК PARP-1 щурів (GenBank № NM\_013063). Інтенсивність експресії мРНК  $\beta$ -актину слугувала додатковим контролем кількості РНК, взятої для аналізу. Для ампліфікації мРНК  $\beta$ -актину використовували праймери – прямий (5'-CGTACCACTGGCATCGTGAT-3') та зворотний (5'-GTGTTGGCGTACAGGTCTTT-3'). ПЛР проводили на апараті «Stratagene Mix 3000P cycler» (США), використовуючи SYBRGreen Mix («AB gene», Велика Британія). Результати аналізували за допомогою спеціальної комп'ютерної програми «Differential expression calculator»; статистичний аналіз здійснювали з використанням MS Excel. Розраховували середні арифметичні значення числових даних, одержаних у трьох–п'яти незалежних експериментах, та середні квадратичні відхилення ( $M \pm s.d.$ ). Вірогідність міжгрупових відмінностей оцінювали за допомогою  $t$ -критерію Ст'юдента. Різниці вважали вірогідними при  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ

Оцінка рівня глюкози в крові тварин досліджуваних груп дозволяла визначити валідність використаної експериментальної моделі ЦД 1-го типу. Маса тіла тварин та рівень глюкози в крові на початку проведення експериментів у всіх досліджуваних групах були практично однаковими. Через 12 тижнів розвитку СТЗ-індукованого ЦД 1-го типу маса тіла щурів з діабетом зменшувалась у середньому на 24.3 %, а рівень глюкози в крові підвищувався в 3.7 разу порівняно з відповідними показниками на початку експерименту (див. таблицю), тобто у тварин після ін'єкцій СТЗ розвивалася некомпенсована гіперглікемія.

Тривале введення інгібіторів PARP-1 (ISO або Nam) контрольним щурам не призводило до змін ані маси тіла, ані концентрації глюкози в крові. Введення цих інгібіторів не впливало на масу тіла і у тварин з діабетом (даний показник при дії досліджуваних інгібіторів PARP-1 істотно не зростає). Застосування вказаних інгібіторів також практично не знижувало рівень глюкози в крові таких тварин.

Як відомо, гіперглікемія, спричинена ЦД 1-го типу, може виникати не лише внаслідок розвитку дисфункції панкреатичних  $\beta$ -клітин, індукованої дією різних ендо- та екзогенних чинників, що в кінцевому рахунку може призводити до втрати згаданих клітин. Це може відбуватись і при підвищенні вмісту прозапальних цитокінів у кровообігу [19]. Незважаючи на те, що у здорових людей цитокіни присутні лише в слідових кількостях, ефекту цих агентів можуть бути досить значними, оскільки їх дія реалізується через специфічні високоафінні рецептори, локалізовані на зовнішній поверхні цитоплазматичної мембрани клітин. Утворення й секреція цитокінів чітко регулюються, що забезпечує адекватні міжклітинні і міжсистемні взаємодії в організмі. Це дозволяє підтримувати нормальні рівні виживання клітин, стимулювати або пригнічувати їх ріст, диференціювання, функціональну активність та інтенсивність апоптозу, а також забезпечувати узгодженість функціонування імунної, ендокринної та нервової систем у фізіологічних умовах та в разі дії різних чинників [20, 21]. Спектри проявів біологічної активності цитокінів можуть у значній мірі перекриватись, оскільки різні цитокін-рецепторні комплекси можуть активувати одні й ті ж самі протеїни-переносники сигналу. Роль антизапальних цитокінів у патогенезі ЦД 1-го типу на



**Маса тіла та рівень глюкози в крові експериментальних щурів,  $M \pm s.d.$  ( $n = 5$ )**

Групи	Маса тіла, г		Рівень глюкози в крові, мМ	
	початкова	в кінці 12-го тижня	початкова	в кінці 12-го тижня
Контрольна	110 ± 12	353 ± 27	5.1 ± 0.5	5.3 ± 1.5
Тварини з цукровим діабетом (ЦД)	112 ± 9	288 ± 23*	5.1 ± 0.5	19.4 ± 2.3*
Тварини з ЦД при введенні 1,5-ізохіноліндіолу (ISO)	109 ± 10	223 ± 10 <sup>+</sup>	5.1 ± 0.5	18.8 ± 1.4
Тварини з ЦД при введенні нікотинамиду (NAм)	110 ± 10	286 ± 15	5.1 ± 0.5	18.0 ± 1.7

Примітки. \* $P < 0.05$  у порівнянні з контрольною групою; <sup>+</sup> $P < 0.05$  у порівнянні з групою тварин із ЦД.

пізніх етапах його розвитку, тобто за наявності ДН, як і можлива здатність інгібіторів PARP-1 впливати на ці агенти, поки що залишаються остаточно не з'ясованими.

Вміст IL-4 в сироватці крові експериментальних щурів при розвитку ДН був вищим на 50% у порівнянні з контролем; вміст гамма-інтерферону (IFN- $\gamma$ ) також збільшувався. Введення ISO призвело до зниження вмісту лише IL-4; NAм не впливав на досліджувані показники. Під час розвитку ДН не було також виявлено вірогідних змін концентрації гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора (GM-CSF). Останній є фактором росту, який стимулює функціональну активність нейтрофілів, еозинофілів і моноцитів та може продукуватись у тканинах різних типів.

Оскільки TNF- $\alpha$ , котрий продукується моноцитами і макрофагами, залучений до патогенезу багатьох захворювань, зокрема хвороби Альцгеймера, (в умовах якої було виявлено зв'язок між рівнями TNF- $\alpha$  і бета-амілоїдного протеїну [22, 23]), було доцільним визначити вміст цього фактора в сироватці крові у тварин з ДН. Виявилося, проте, що вміст TNF- $\alpha$  у щурів в порівнянні з контролем не змінювався (рис. 2). В той же час вміст IL-1 $\alpha$ , який є позаклітинним пептидом, демонстрував зростання. Інтерлейкіни типу 1 (IL-1) є біологічно активними протеїнами, які продукуються макрофагами і Т-лімфоцитами та залучені до розвитку запальних реакцій та імунних відповідей організму. У відповідь на дію широкого спектра цитокінів, зокрема таких, як IL-6, TNF- $\alpha$  та IL-1 $\beta$ , в організмі продукується моноцитарний хемотаксич-

ний протеїн-1 (MCP-1). Завдяки своїй специфічності щодо клітин-мішеней він відіграє важливу роль у розвитку різних захворювань (хвороба Альцгеймера, атеросклероз, вірусні інфекції тощо). Як ми з'ясували, вміст MCP-1 у сироватці крові щурів із ЦД у разі розвитку ДН зростав до рівня  $53.57 \pm 6.79$  порівняно з  $28.8 \pm 8.16$  пг/мл у контролі, тобто майже вдвічі (рис. 3). Тривале введення ISO призвело до нормалізації цього показника; у той же час ефект NAм був у даному аспекті незначним.

*Полі-ADP-рибозилування в тканинах мозку в умовах розвитку ДН.* Не виключено, що на тлі розвитку запальних процесів процес ендogenous ADP-рибозилування ядерних протеїнів – один із ключових механізмів розвитку ДН – інтенсифікується. У наших попередніх дослідженнях було показано, що в умовах ЦД 1-го типу у щурів окислювальний стрес у головному мозку посилюється, а полі-ADP-рибозилування ядерних протеїнів у відповідь на пошкодження ДНК активується [24]. Проте питання щодо зв'язку процесів полі-ADP-рибозилування протеїнів із дисфункціями головного мозку в разі розвитку ДН залишається відкритим. Тому ми намагались оцінити не тільки рівень процесів полі-ADP-рибозилування протеїнів у мозку в умовах ДН, але й модуляцію даного процесу специфічними інгібіторами PARP-1. Застосування цих агентів може стати новим фармакологічним підходом у терапії ускладнень ЦД.

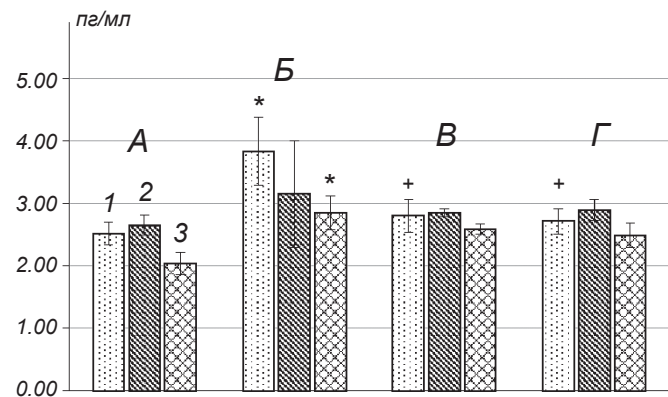
Виявилося, що при майже однаковій експресії мРНК гена *PARP-1* (рис. 4) розвиток ДН призводить до посилення апоптотичних процесів у мозку щурів. Свідченням цього є посилення протеолітично-

го розщеплення PARP-1 та збільшення відношення вміст фрагмента 89 кДа/вміст цільних молекул ензиму (рис. 5). Досліджувані інгібітори не впливали на рівень експресії мРНК гена *PARP-1* у мозку щурів із ЦД (рис. 4), але тривале введення даних інгібіторів супроводжувалося пригніченням активності ензиму і, відповідно, послабленням протеолітичного розщеплення PARP-1. Підтвердженням цього є зниження відношення вмістів фрагмента 89 кДа та цільних молекул ензиму (рис. 5).

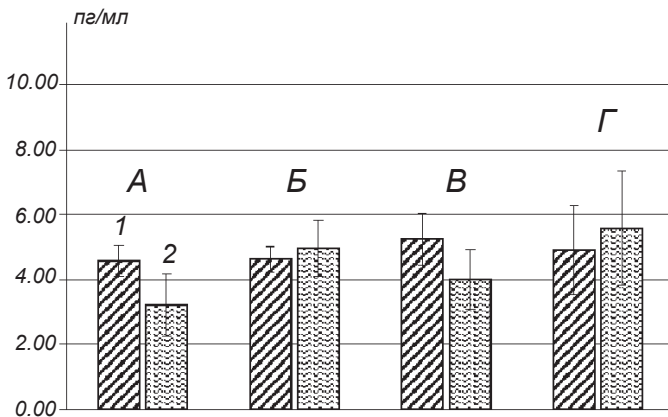
Підвищений вміст фрагмента PARP-1 89 кДа у мозку щурів із ЦД (рис. 6) може бути зумовлений

посиленою активацією ензиму та збільшенням рівня полі-ADP-рибозильованих протеїнів (PARs). Останні можуть як з'являтися на етапі репарації пошкоджень ДНК, так і залучатись у регулювання транскрипції генів. Процес полі-ADP-рибозилування залучений у ремодельовання структури хроматину [25], а також може бути наслідком захисної реакції організму в умовах надмірного вичерпання енергетичних ресурсів клітин мозку. Дійсно, як свідчать отримані нами дані, ці результати корелюють не тільки з активністю PARP-1 в ядрах мозку щурів (рис. 7), але й із рівнем NAD (рис. 8).

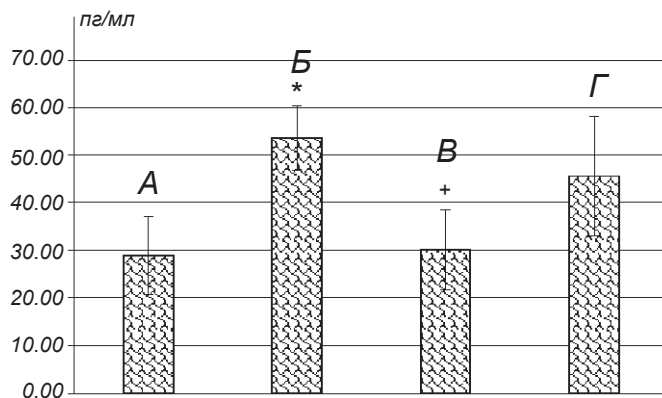
Обидва інгібітори PARP-1 – ISO і NAm – інгібували активність ензиму, причому дія ISO була інтенсивнішою (рис. 7). При розвитку ДН вміст NAD у мозку тварин із ЦД був зниженим у серед-



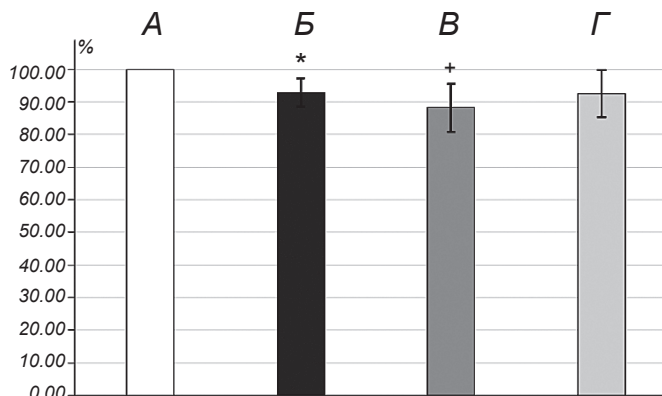
**Р и с. 1.** Вміст інтерлейкіну-4 – IL-4 (1), гранулоцитарно-макрофагального колоніестимулюючого фактора – GM-CSF (2) та гамма-інтерферону – IFN- $\gamma$  (3) в сироватці крові щурів при цукровому діабеті (ЦД) 1-го типу (пг/мл) у щурів контрольної групи (А), тварин із ЦД (Б), тварин із ЦД при уведеннях 1,5-ізохіноліндіолу (В) або нікотинамідом (Г).  
\* $P < 0.05$  у порівнянні з контрольною групою; + $P < 0.05$  у порівнянні з групою тварин із ЦД.



**Р и с. 2.** Вміст фактора некрозу пухлини альфа – TNF- $\alpha$  (1) та інтерлейкіну-1 $\alpha$  – IL-1 $\alpha$  (2) в сироватці крові щурів при цукровому діабеті 1-го типу (пг/мл). Решта позначень ті ж самі, що й на рис. 1.



**Р и с. 3.** Вміст моноцитарно-хемотаксичного протеїну-1 (MCP-1) в сироватці крові щурів при цукровому діабеті 1-го типу (пг/мл). Позначення ті ж самі, що й на рис. 1.

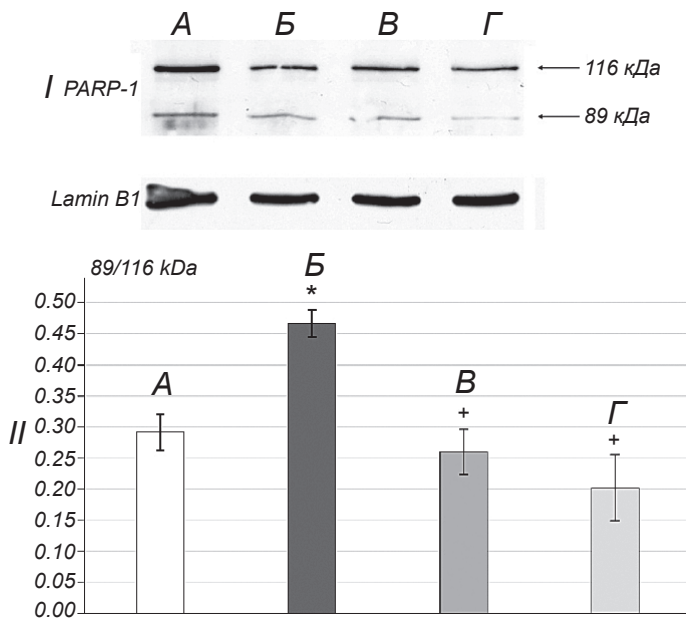


**Р и с. 4.** Відносна експресія мРНК гена *PARP-1* у мозку щурів при цукровому діабеті 1-го типу (%; за 100 % прийнято контроль). Позначення ті ж самі, що й на рис. 1.

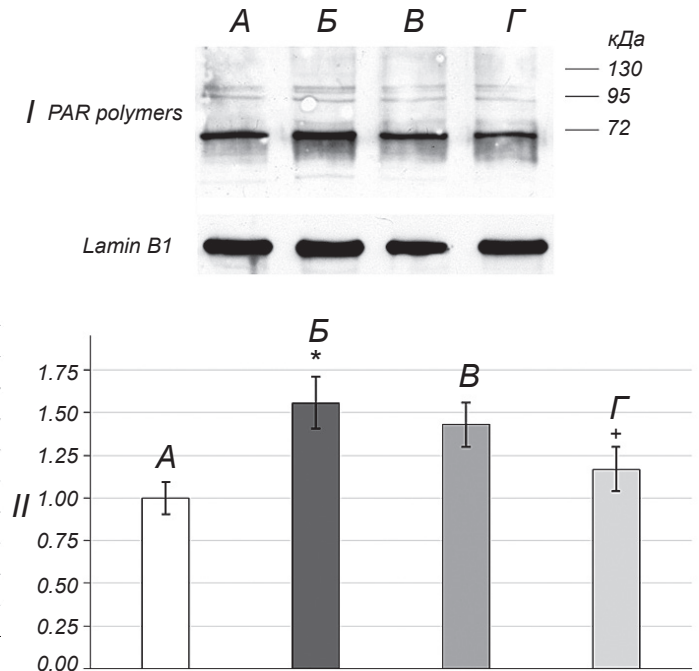
ньому на 33.4 % порівняно з контролем. Застосування NAm забезпечувало підвищення вмісту NAD у мозку згаданих щурів. Це було цілком очікуваним, оскільки введення даного інгібітора сприяло поповненню пулу динуклеотиду, надзвичайно необхідного для нормального функціонування ключових метаболічних процесів. Уведення ISO щурам із ЦД не призводило до змін вмісту згаданого динуклеотиду в мозку.

## ОБГОВОРЕННЯ

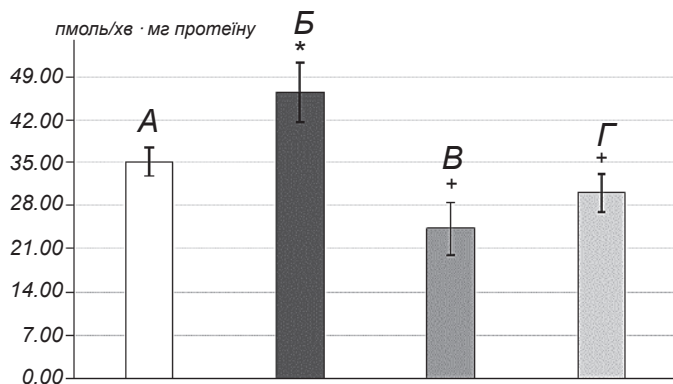
З урахуванням отриманих даних стає очевидним, що між гіперглікемією, розвитком запальних процесів в організмі та активацією PARP-1, супроводжуваною фрагментацією цього ензиму, існують явні функціональні зв'язки. Порушення таких зв'язків призводить до розвитку ДН та енцефалопатії зокрема. Застосування специфічних інгібіторів PARP-1



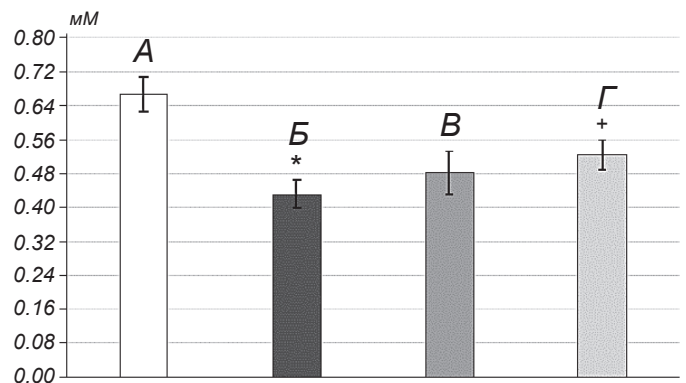
**Рис. 5.** Результати Вестерн-блотингу фрагмента PARP-1 (89 кДа) та цілої молекули цього ензиму (116 кДа) в ядерному екстракті тканини мозку щурів. I – блотограма, II – результати денситометрії,  $M \pm s.d.$  ( $n = 4 - 5$ ). Решта позначень ті ж самі, що й на рис. 1.



**Рис. 6.** Результати Вестерн-блотингу полі-ADP-рибозильованих протеїнів в ядерному екстракті тканини мозку щурів. I – блотограма, II – результати денситометрії,  $M \pm s.d.$  ( $n = 4 - 5$ ). Решта позначень ті ж самі, що й на рис. 1.



**Рис. 7.** Активність ензиму PARP-1 в ядрах мозку щурів,  $M \pm s.d.$  ( $n = 4 - 5$ ). Позначення ті ж самі, що й на рис. 1.



**Рис. 8.** Вміст NAD<sup>+</sup> у мозку щурів,  $M \pm s.d.$  ( $n = 4 - 5$ ). Позначення ті ж самі, що й на рис. 1.

частково коригує досліджувані негативні процеси. Це спонукає до пошуку нових інгібіторів даного ензиму, а також можливих шляхів поєднання дії таких агентів та інших біологічно активних сполук, що сприятиме ефективнішому лікуванню ДН.

На тлі розвитку гіперглікемії при ЦД 1-го типу виявлені нами зміни вмісту досліджуваних цитокінів можуть відбуватися не лише за рахунок запальних процесів, індукованих діабетом даного типу, але й за рахунок впливу інших модуляторів. Індукторами їх синтезу можуть бути інфекційні фактори (віруси, бактерії), продукти їх життєдіяльності, токсини, метаболіти, деякі протеїни рослинного походження, харчові та лікарські алергени, а також змінені (модифіковані) клітини власного організму. Більше того, виявлене підвищення вмісту цитокінів IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$  та MCP-1 у сироватці крові щурів із ЦД дозволяє стверджувати, що в умовах розвитку ДН функціональна активність імункомпетентних клітин різних типів змінюється та розвиваються прозапальні процеси. Застосування ISO призводило до зниження рівня моноцитарного хемотаксичного протеїну-1, що, вірогідно, є проявом більш вираженої протизапальної дії ISO порівняно з такою NAm. Істотне збільшення вмісту IL-4 в сироватці крові (у 1.5 разу) тварин з ДН може бути зумовлене тим, що IL-4 не тільки забезпечує протизапальну дію, але й відіграє важливу роль при хронічному перебігу згаданого захворювання. Рівень цього цитокіну може бути одним із проявів компенсаторної відповіді організму. Відомо, що в разі істотного обмеження калорійності споживаної їжі вміст IL-4 знижується [26]. Більше того, IL-4 є антагоністом гамма-інтерферону (IFN- $\gamma$ ) – гомодимерного глікопротеїну, який продукується при запальних станах цитотоксичними Т-клітинами (CD<sub>8</sub>), а також CD<sub>4</sub>-клітинами певного підтипу [27]. Вміст IFN- $\gamma$  в досліджуваних нами умовах розвитку ДН також збільшувався. Інтенсифікація запальних процесів у різних органах у разі розвитку ДН є одним із чинників посилення ангиогенезу [28]. Наші спостереження, а також дані інших авторів свідчать про те, що такий специфічний інгібітор PARP-1, як ISO, має здатність запобігати інтенсифікації ангиогенезу при деяких типах ретинопатій, а також при метастазуванні злоякісних пухлин [29, 30].

Під час дослідження процесу полі-ADP-рибозилування ядерних протеїнів у мозку щурів в умовах розвитку ДН було виявлено, що активність PARP-1 підвищується; доказом цього є фрагментація даного ензиму. Активація PARP-1 призводить

до зниження рівня її субстрату – NAD; це, в свою чергу, уповільнює гліколіз, пригнічує функціонування ланцюга транспорту електронів та зменшує утворення АТФ. Такі зміни можуть зумовлювати загибель клітин мозку. Очевидно, PARP-1 відіграє важливу регуляторну роль у розвитку дисфункцій ЦНС [31]. При ЦД 1-го типу на пізніх стадіях його розвитку основними причинами виникнення діабетичної енцефалопатії є порушення рівноваги між процесами збудження та гальмування нейронів у результаті порушення процесів екзоцитозу. Про це свідчили результати наших попередніх досліджень [32]; виявлена нами активація полі-ADP-рибозилування ядерних протеїнів, що супроводжується фрагментацією PARP-1 на тлі розвитку запальних процесів, також підтверджує наведений вище висновок.

Вибрані нами специфічні інгібітори PARP-1, як з'ясувалося, здатні не тільки зменшувати активність вказаного ензиму, але й пригнічувати розвиток запальних процесів. Крім впливу на ці процеси, досліджувані інгібітори, як було показано нами раніше, зменшують у щурів інтенсивність проявів окислювального стресу в лейкоцитах крові при ЦД 1-го типу [5]. Отримані нами дані узгоджуються з результатами інших авторів, які також продемонстрували досить широкий спектр дії інгібіторів PARP-1 [33]. Так, при застосуванні NAm, який інгібує активність PARP-1 у мозку щурів, позитивна дія вказаного агента може реалізовуватися також за рахунок пригнічення синтезу ліпідів [34]. Той факт, що NAm запобігає деградації PARP-1 та сприяє репарації ДНК в результаті прямого інгібування каспази-3 (це показано щодо нервових клітин), свідчить на користь можливості реалізації аналогічним чином його цитопротекторної дії на клітини мозку щурів [35, 36]. Більше того, застосування NAm, запобігаючи вичерпанню пулу NAD (у синтезі якого він є попередником), сприяє функціонуванню інших регуляторних NAD-залежних процесів [37–39]. Варто також зазначити, що ISO також здатен інгібувати індукцибельну NO-синтазу; тому не виключено, що він може запобігати утворенню пероксинітриду – одного із токсичних оксидантів [40].

Згідно з даними інших авторів, механізм дії ISO на ЦД-індуковані дисфункції мозку щурів може реалізуватися і через позитивний вплив даного інгібітора на процеси в нейронах тварин. При цьому ISO інгібує пероксидне окиснення ліпідів, покращує функціонування ацетилхолінестерази та част-



ково нормалізує рівні ГАМК і глутамату в гіпокампі [41].

Не виключено також, що фармакологічною мішенню дії як NAm, так і ISO є рецептори потенціалзалежних кальцієвих каналів [38]. Слід також згадати, що серед механізмів дії інгібіторів PARP вказується вплив таких агентів не тільки на субклітинному, але й на клітинному рівні (при використанні культури клітин) [42].

Застосування специфічних інгібіторів PARP-1 дозволило нам виявити їх модулюючі впливи і на індуковані ЦД запальні процеси, і на досліджуваній процес полі-ADP-рибозилування ядерних протеїнів. Іншими словами, отримані дані свідчать про те, що активність PARP-1 підвищується не лише за необхідності репарації можливих розривів молекули ДНК в умовах ДН [24, 43], але і в результаті інтенсифікації оксидативно-нітрозативного стресу та активації MAP-кіназ [44]. До теперішнього часу, проте, залишається остаточно не з'ясованим, за рахунок яких саме механізмів відбувається активація PARP-1. Згідно з існуючими даними, в умовах оксидативно-нітрозативного стресу PARP-1 взаємодіє із гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназою, котра транслокується до ядра в умовах як *in vitro*, так і *in vivo* [45]. Цитовані автори вважають, що гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа є ключовим регулятором активності PARP-1, оскільки порушення взаємодії цих ензимів значно знижує надлишкову активацію PARP-1 та захищає мозок щурів від ушкоджень при інсульті. Не виключено, що такий самий сценарій реалізується в умовах розвитку ДН. Підвищення активності PARP-1 та утворення і накопичення фрагментів молекул ензиму в результаті його посиленого протеолітичного розщеплення можуть призводити до незалежної від каспаз унікальної форми загибелі клітин мозку, котру називають «Партанатос» (Parthanatos). У цих умовах відбувається транслокація фактора, індукуючого апоптоз (AIF), із мітохондрій в ядро [46].

Наші результати дають підстави вважати, що протекторна дія досліджуваних інгібіторів PARP-1 щодо дисфункцій мозку реалізується не лише за рахунок специфічної дії вказаних інгібіторів, але й через їх вплив на інші метаболічні процеси, а також на структуру та функції нейронних мембран. Саме тому на даний час багато інгібіторів PARP-1 все частіше почали застосовувати як протипухлинні засоби, причому як окремо, так і в комплексній терапії [47, 48].

Узагальнюючи отримані дані, можна констатувати, що в умовах розвитку ДН ядерний ензим PARP-1 є однією з основних функціональних мішеней, через яку здійснюється дія ISO та NAm. Здатність цих інгібіторів PARP-1 запобігати загибелі клітин мозку за сценарієм «Партанатос» свідчить про можливість реалізації їх дії на молекулярному рівні. Вони сприяють підтриманню цілісності геному в нервових структурах мозку в умовах ДН та запобігають розвитку запальних процесів. Таким чином, ці агенти можуть знайти застосування для лікування ДН.

Дослідження були проведені із дотриманням положень Європейської Конвенції щодо захисту тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та інших наукових цілях (86/609 ЄС, 1986, Страсбург), та відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених на 1-му Національному конгресі з біоетики (Київ, 2001).

Автори даної роботи – М. М. Гузик, К. О. Дякун, Л. В. Яницька, І. Б. Привроцька, І. Я. Криницька, І. М. Пішель та Т. М. Кучмеровська – підтверджують відсутність будь-яких конфліктів стосовно комерційних або фінансових відносин, відносин з організаціями або особами, котрі будь-яким чином могли бути пов'язані з дослідженням, і взаємовідносин співавторів статті.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. A. I. Vinik, M. L. Nevoret, C. Casellini, et al., "Diabetic neuropathy," *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.*, **42**, No. 4, 747-787 (2013).
2. S. Tesfaye, A. J. M. Boulton, P. J. Dyck, et al., "On behalf of the Toronto diabetic neuropathy expert group. Diabetic neuropathies: Update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments," *Diabetes Care*, **33**, No. 10, 2285-2293 (2010).
3. A. Hosseini and M. Abdollahi, "Diabetic neuropathy and oxidative stress: therapeutic perspectives," *Oxid. Med. Cell. Longev*, Publ. online, April 24 (2013).
4. Р. В. Ставнійчук, Т. М. Кучмеровська, "Діабетична нейропатія. Роль 12/15-ліпоксигенази та метаболізму арахідонової кислоти", *Ендокринологія*, **19**, № 2, 156-166 (2014).
5. М. М. Гузик, К. О. Дякун, Л. В. Яницька, Т. М. Кучмеровська, "Вплив інгібіторів полі(ADP-рибозо)полімерази на деякі показники оксидативного стресу у лейкоцитах крові щурів за експериментального цукрового діабету", *Укр. біохім. журн.*, **85**, № 1, 62-70 (2013).
6. Т. М. Кучмеровська, Г. В. Донченко, Т. М. Тихоненко та ін., "Вплив нікотинаміду на життєздатність острівцевих клітин підшлункової залози", *Укр. біохім. журн.*, **84**, № 2, 81-88 (2012).
7. P. Sytze Van Dam, M. A. Cotter, B. Bravenboer, et al., "Pathogenesis of diabetic neuropathy: Focus on neurovascular mechanisms," *Eur. J. Pharmacol.*, **719**, Nos. 1/3, 180-186 (2013).

8. R. V. Stavnichuk, A. A. Obrosof, V. R. Drel, et al., "12/15-Lipoxygenase inhibition counteracts MAPK phosphorylation in mouse and cell culture models of diabetic peripheral neuropathy," *J. Diabetes Mellitus*, **3**, No. 3, doi: 10.4236/jdm.2013.33015, Aug. (2013).
9. S. Chattopadhyay, M. Ramanathan, J. Das, and S. K. Bhattacharya, "Animal models in experimental diabetes mellitus," *Ind. J. Exp. Biol.*, **35**, No. 11, 1141-1145 (1997).
10. D. H. Williamson, P. Lund, and H. A. Krebs, "The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver," *Biochem. J.*, **103**, No. 2, 514-527 (1967).
11. C. N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, et al., "How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein," *Protein Sci.: Publ. Protein Soc.*, **4**, No. 11, 2411-2423 (1995).
12. M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
13. Y. Tanigawa, M. Kawamura, and M. Shimoyama, "Effect of polyamines on ADP-ribosylation of nuclear proteins from rat liver," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, No. 2, 406-412 (1976).
14. T. E. Shaiken and A. R. Opekun, "Dissecting the cell to nucleus, perinucleus and cytosol," *Sci. Reports*, **4**, 4923, doi: 10.1038/srep04923 (No. 4, 4983) (2014).
15. U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4," *Nature*, **227**, No. 5259, 680-685 (1970).
16. M. M. Andres and J. J. Luszczki, "Modified Western blot technique in fast detection of heme oxygenase (ho-1/ho-2) in various tissues and organs of experimental animals," *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska. Sectio D: Medicina*, **59**, No. 2, 298-302 (2004).
17. C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams, "Real time quantitative PCR," *Genome Res.*, **6**, No. 10, 986-994 (1996).
18. A. G. Minchenko, V. E. Armstead, I. L. Opentanova, and A. M. Lefer, "Endothelin-1, endothelin receptors and eNOS gene transcription in vital organs during traumatic shock in rats," *Endothelium: J. Endothel. Cell Res.*, **6**, No. 4, 303-314 (1999).
19. A. S. Greenberg and M. L. McDaniel, "Identifying the links between obesity, insulin resistance and beta-cell function: potential role of adipocyte-derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes," *Eur. J. Clin. Investat.*, **32**, Suppl. 3, 24-34 (2002).
20. C. A. Dinarello, "Proinflammatory cytokines," *Chest*, **118**, No. 2, 503-508 (2000).
21. S. M. Opal and V. A. DePalo, "Anti-inflammatory cytokines," *Chest*, **117**, No. 4, 1162-1172 (2000).
22. K. Bhaskar, N. Maphis, G. Xu, et al., "Microglial derived tumor necrosis factor- $\alpha$  drives Alzheimer's disease-related neuronal cell cycle events," *Neurobiol. Dis.*, **62**, Febr. 273-285 (2014).
23. V. Sharma, V. Thakur, S. N. Singh, and R. Guleria, "Tumor necrosis factor and Alzheimer's disease: a cause and consequence relationship," *Bull. Clin. Psychopharmacol.*, **22**, No. 1, 86-89 (2012).
24. T. Kuchmerovska, I. Shymansky, G. Donchenko, et al., "Poly(ADP-ribosyl)ation enhancement in brain cell nuclei is associated with diabetic neuropathy," *J. Diabetes Comp.*, **18**, No. 4, 198-204 (2004).
25. N. V. Maliuchenko, O. I. Kulaeva, E. Kotova, et al., "Molecular mechanisms of regulation of transcription by PARP1," *Mol. Biol.*, **49**, No. 1, 99-113 (2015).
26. N. H. Ugochukwu and C. L. Figgers, "Caloric restriction inhibits up-regulation of inflammatory cytokines and TNF-alpha, and activates IL-10 and haptoglobin in the plasma of streptozotocin-induced diabetic rats," *J. Nutr. Biochem.*, **18**, No. 2, 120-126 (2007).
27. M. Cnop, N. Welsh, J. C. Jonas, et al., "Mechanisms of pancreatic  $\beta$ -cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities," *Diabetes*, **54**, No. 2, S97-S107 (2005).
28. P. Z. Costa and R. Soares, "Neovascularization in diabetes and its complications. Unraveling the angiogenic paradox," *Life Sci.*, **92**, No. 22, 1037-1045 (2013).
29. M. Rajesh, P. Mukhopadhyay, G. Godlewski, et al., "Poly (ADP-ribose)polymerase inhibition decreases angiogenesis," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **350**, No. 4, 1056-1062 (2006).
30. M. M. Guzyk, A. A. Tykomyrov, V. S. Nedzvetsky, et al., "Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors reduce reactive gliosis and improve angiostatin levels in retina of diabetic rats," *Neurochem. Res.*, **41**, No. 10, 2526-2537 (2016).
31. T. M. Kauppinen and R. A. Swanson, "The role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in CNS disease," *Neuroscience*, **145**, No. 4, 1267-1272 (2007).
32. I. Triakash, V. Gumenyuk, and T. Kuchmerovska, "Diabetes-induced impairments of the exocytosis process and effect of gabapentin: the link with cholesterol level in neuronal plasma membranes," *Neurochem. Res.*, **40**, No. 4, 723-732 (2015).
33. D. V. Ferraris, "Evolution of poly(ADP-ribose) polymerase1 (PARP1) inhibitors. From concept to clinic," *J. Med. Chem.*, **53**, No. 12, 4561-4584 (2010).
34. K. L. Bogan and C. Brenner, "Nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinamide riboside: a molecular evaluation of NAD<sup>+</sup> precursor vitamins in human nutrition," *Annu. Rev. Nutr.*, **28**, 115-130 (2008).
35. Z.-Z. Chong, S.-H. Lin, F. Li, and K. Maiese, "The sirtuin inhibitor nicotinamide enhances neuronal cell survival during acute anoxic injury through Akt, Bad, PARP, and mitochondrial associated "anti-apoptotic" pathways," *Current Neurovascul. Res.*, **2**, No. 4, 271-285 (2005).
36. D. Surjana, G. M. Halliday, and D. L. Damian, "Role of nicotinamide in DNA damage, mutagenesis, and DNA repair," *J. Nucl. Acids*, doi: 10.4061/2010/157591 (2010).
37. R. H. Houtkooper, C. Canto, R. J. Wanders, and J. Auwerx, "The secret life of NAD<sup>+</sup>: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways," *Endocrinol. Rev.*, **31**, No. 2, 194-223 (2010).
38. A. H. Guse, "Biochemistry, biology, and pharmacology of cyclic adenosine diphosphoribose (CADPR)," *Current Med. Chem.*, **11**, No. 7, 847-855 (2004).
39. E. Ferrero, N. Lo Buono, A. L. Horenstein, et al., "The ADP-ribosyl cyclases--the current evolutionary state of the arcs," *Front. Biosci. (Landmark Edit.)*, **19**, 986-1002 (2014).
40. R. Olszanecki, A. Gebaska, J. Jawieñ, et al., "Inhibition of NOS-2 induction in LPS-stimulated J774.2 cells by 1,5-isoquinolinediol, an inhibitor of PARP," *J. Physiol. Pharmacol.*, **57**, No. 1, 109-117 (2006).
41. A. Jangra, A. K. Datusalia, and S. S. Sharma, "Reversal of neurobehavioral and neurochemical alterations in STZ-induced

- diabetic rats by FeTMPyP, a peroxynitrite decomposition catalyst and 1,5-isoquinolinediol, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor," *Neurol. Res.*, **36**, No. 7, 619-626 (2014).
42. L. Efremova, S. Schildknecht, M. Adam, et al., "Prevention of the degeneration of human dopaminergic neurons in an astrocyte co-culture system allowing endogenous drug metabolism," *Br. J. Pharmacol.*, **172**, No. 16, 4119-4132 (2015).
43. V. Schreiber, F. Dantzer, J. C. Ame, and G. de Murcia, "Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, July, 517-528 (2006).
44. R. Stavniichuk, V. R. Drel, H. Shevalye, et al., "Baicalein alleviates diabetic peripheral neuropathy through inhibition of oxidative-nitrosative stress and p38 MAPK activation," *Exp. Neurol.*, **230**, No. 1, 106-113 (2011).
45. H. Nakajima, T. Kubo, H. Ihara, et al., "Nuclear-translocated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during oxidative/nitrosative stress in stroke," *J. Biol. Chem.*, **290**, No. 23, 14493-14503 (2015).
46. S. A. Andrabi, T. M. Dawson, and V. L. Dawson, "Mitochondrial and nuclear cross-talk in cell death: Parthanatos," *Ann. New York Acad. Sci.*, **1147**, 233-241 (2008).
47. S. Benafif and M. Hall, "An update on PARP inhibitors for the treatment of cancer," *Oncotargets Ther.*, **8**, 519-528 (2015).
48. N. J. Curtin and C. Szabo, "Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond," *Mol. Aspects Med.*, **34**, No. 6, 1217-1256 (2012).