УДК 577.164.3:612.349.7

© 2010

**І. О. Шиманський,** член-кореспондент НАН України **Г. В. Донченко, І. М. Трофимова, Н. М. Гуріна, С. М. Супрун, А. П. Клименко, Е. В. Овчіннікова, Т. М. Кучмеровська**

# Цитопротекторна дія нікотинаміду на бета-клітини підшлункової залози

*Досліджено вплив нікотинаміду (NAm) на життєдіяльність ізольованих бета-клітин підшлункової залози щурів in vitro. Було виявлено захисну дію NAm на виживання бета-клітин на фоні цитотоксичних ефектів стрептозотоцину, що, імовірно, зумовлена прямою модуляторною дією NAm на PARP-залежні процеси, які залучені до механізму загибелі клітин, а також і опосередкованими метаболічними та антиоксидантними ефектами сполуки.*

Відомо, що нікотинамід (NAm, одна із форм вітаміну $B_3$) є важливою природною сполукою з широким спектром біологічної дії [1]. Серед численних функцій NAm слід відзначити, зокрема, його здатність як самостійно, так і за участю біологічно активних похідних модулювати шляхи обміну та клітинної сигналізації, які тісно пов'язані із забезпеченням нормальної життєдіяльності клітин та з їхньою загибеллю. Демонструючи тісну взаємодію коферментних та некоферментних функцій в реалізації механізмів своєї біологічної дії, NAm здатен гальмувати оксидативний стрес, блокувати запальні процеси в тканинах, деградацію ДНК та відігравати цитопротекторну роль при різних захворюваннях. Один з основних аспектів реалізації захисних ефектів Nam полягає у пригніченні ензиматичного $NAD^+$-залежного ADP-рибозилювання функціонально важливих протеїнів, тобто процесу, що активується в результаті вільнорадикального та окиснювального пошкодження ДНК [2].

Вітамін $B_3$ та його біоактивні похідні можуть знайти потенційне застосування в корекції дефіциту інсуліну, інсулінорезистентності та пов'язаних з нею метаболічних порушень, а також з метою лікування діабетичних ускладнень. Зокрема, нами показано, що NAm та похідні вітаміну $B_3$ проявляють нейротропну дію при діабетичній невропатії [2].

Як відомо [1, 3], цукровий діабет 1 типу характеризується прогресуючою автоімунною деструкцією бета-клітин підшлункової залози, яка призводить до дефіциту інсуліну. З іншого боку, порушення секреції інсуліну бета-клітинами у відповідь на дію глюкози, зниження тканинної чутливості до гормону або одночасне поєднання цих процесів є патогенетичною основою діабету 2 типу [1, 5]. При цьому слід відзначити, що дисфункція інсулярного апарату, розвиток інсулінорезистентності та ускладнень цукрового діабету можуть бути результатом окисидативного стресу в клітинах [6]. У свою чергу, гіперглікемія сприяє інтенсифікації утворення активних кисневих метаболітів — супероксид аніон-радикали, гідроген пероксид, синглетний кисень, оксид азоту, пероксинітрит [1, 4] — у багатьох типах клітин, у тому числі і в продуктующих інсулін [1, 6]. Їх надмірне утворення може призводити до пошкодження та загибелі клітин внаслідок розвитку оксидативного стресу [7, 8].

У зв'язку з зазначеним вище, дослідження функціональної активності бета-клітин на експериментальних моделях, які відображають умови їхньої життєдіяльності при цукровому діабеті, а також пошук сполук, які здатні нормалізувати функції цих клітин, є актуальною проблемою.

У зв'язку з цим, метою роботи було оцінити життєздатність ізольованих бета-клітин при різних концентраціях глюкози *in vitro* та схарактеризувати можливість протекторної дії NAm на індуковану стрептозотоцином (СТЗ) загибель цих клітин.

Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Вістар масою 140–170 г. Після декапітації тварин було швидко вилучено підшлункову залозу, з якої з використанням колагенази виділяли бета-клітини острівців Лангерганса, модифікуючи методику [9]. Залозу поміщали в буферний розчин Кребс–Рінгера pH 7,3, що містив HEPES (КРХ). Після промивки та відокремлення від жирової тканини її подрібнювали скальпелем до частинок розміром приблизно 2 мм$^3$ та додавали розчин колагенази. В наших експериментах оптимальні були такі умови: концентрація колагенази — 2 мг/мл, температура — 37 °С, кількість струшувань — 2/с, час — 20 хв. Після відмивання від ферменту острівці Лангерганса ресуспендували в інкубаційному середовищі без колагенази, потім після двох центрифугувань двічі осаджували звичайним відстоюванням упродовж 4–5 хв. Отриманий осад ресуспендували у свіжоприготовленому КРХ розчині та переносили в малі чашки. Під мікроскопом (зб. 100) відбирали острівці Лангерганса за допомогою мікропіпетки. Для виділення бета-клітин певну кількість острівців переносили в поліетиленові мікропробірки, які містили 200 мкл КРХ, та струшували на мікрострушувачі Beckman (Model 154) протягом 10 хв. Отримані бета-клітини інкубували у середовищі RPMI-1640 з додаванням 0,1%-го БСА, антибіотиків та відповідних концентрацій досліджуваних сполук. Інкубування проводили у планшетах при 37 °С у $CO_2$-інкубаторі з 5%-м вмістом $CO_2$ та при 100%-й вологості. Життєздатність бета-клітин оцінювали за допомогою фарбування трипановим синім відразу після отримання клітин, через 1 та 5 діб. Нежиттєздатні клітини впродовж 3–5 хв нагромаджували трипановий синій після додавання 0,5%-го розчину цього барвника. Кількість живих та мертвих клітин підраховували в камері Горяєва. Статистичну обробку цих даних здійснювали комп'ютерною програмою Microsoft Excel 2007, використовуючи стандартний критерій $t$-Стьюдента для некорильованих вибірок.

Порушення метаболізму глюкози є одним з основних факторів, залучених до розвитку цукрового діабету, тому важливо було оцінити вплив глюкози на виживання бета-клітин підшлункової залози в широкому діапазоні концентрацій (2,8; 5; 10 та 20 ммоль/л). За даними табл. 1, глюкоза при концентрації 10 ммоль/л найефективніше впливала на виживання клітин.

При вивченні сумісної дії глюкози та NAm на життєздатність клітин встановлено, що їхня дія найбільш виражена за таких умов: концентрація глюкози 10 ммоль/л (див. табл. 1);

*Таблиця 1.* Вплив нікотинаміду на виживання бета-клітин підшлункової залози щурів при різних концентраціях глюкози *in vitro* (% живих клітин, $M \pm m$, $n = 5$)

| Діючий фактор, ммоль/л | Період інкубування, год | |
|---|---|---|
| | 24 | 120 |
| Контроль (глюкоза, 5,0) | 85,0 ± 5,2 | 77,4 ± 6,3 |
| Глюкоза, 2,8 | (73,4 ± 5,0)* | (69,7 ± 4,8)* |
| Глюкоза, 10,0 | 90,7 ± 8,3 | (84,0 ± 9,1)* |
| Глюкоза, 20,0 | 88,1 ± 6,5 | (85,2 ± 5,8)* |
| Глюкоза, 5,0 + NAm, 5,0 | 87,0 ± 6,2 | (83,1 ± 7,6)* |
| Глюкоза, 10,0 + NAm, 5,0 | 89,6 ± 7,0 | (84,6 ± 7,2)* |
| Глюкоза, 20,0 + NAm, 5,0 | 86,5 ± 5,7 | (81,9 ± 6,9)* |

*Вірогідність різниць у порівнянні з контролем, $p < 0{,}05$.

NAm 5 ммоль/л (табл. 2). Також доцільним було з'ясувати, яким є вплив глюкози при різних концентраціях на фоні оптимальної концентрації NAm, однак жодного модулювального ефекту NAm при цій концентрації на життєздатність досліджуваних клітин нами не виявлено (див. табл. 1).

Дія NAm в обраних концентраціях залежно від терміну культивування була різною. Так, упродовж першої доби кількість живих клітин практично не зменшувалася (див. табл. 2). Через добу після додавання NAm (5 ммоль/л) кількість живих клітин становила 92% та зменшувалася при культивуванні впродовж 5 діб до 15%. Виявлено, що NAm не проявляв цитотоксичну дію протягом доби навіть при концентрації 20 ммоль/л. Проте через 5 діб його цитопротекторна дія не зберігалась, а при концентрації 15 й 20 ммоль/л, взагалі була відсутня, крім того, при концентрації понад 20 ммоль/л зростала цитотоксичність NAm (не наведено).

Інкубування бета-клітин з такою діабетогенною сполукою, як СТЗ при концентрації 5 ммоль/л, викликає їхню загибель. Нами оцінена здатність NAm проявляти цитопротекторну дію на життєздатність бета-клітин після впливу СТЗ. Після преінкубування клітин із СТЗ їх відмивали, в середовище додавали NAm, кінцева концентрація якого дорівнювала, ммоль/л: 0,2; 1; 2; 5; 15; 20. Термін інкубування — одна та п'ять діб. Контрольні аліквоти клітин не містили NAm й СТЗ. За таких умов нами було виявлено настільки виражену цитотоксичну дію СТЗ, що вже через добу спостерігали загибель близько 90% клітин (див. табл. 2). Показано, що вплив NAm на клітини, які зазнали дії СТЗ, є дозозалежним. Як видно з представлених у табл. 2 даних, цитопротекторний вплив NAm був найефективнішим при концентрації 5 ммоль/л, хоча і при концентрації 2 ммоль/л він був достатньо ефективним, про що свідчить зменшення кількості загиблих клітин. Подібну картину ми спостерігали при дії 3-амінобензаміду (дані не наведено). Однак слід зазначити, що цитопротекторна дія NAm на життєздатність бета-клітин зберігалась лише протягом однієї доби, оскільки при подальшій інкубації з NAm його вплив був частковим, а через 5 діб — взагалі відсутнім.

*Таблиця 2.* Концентраційнозалежний ефект нікотинаміду на виживання бета-клітин підшлункової залози щурів після дії на них стрептозотоцину *in vitro* (% живих клітин; $M \pm m$, $n = 5$)

| Діючий фактор, ммоль/л | Період інкубування, год | |
|---|---|---|
| | 24 | 120 |
| Контроль (без СТЗ та NAm) | $85{,}0 \pm 5{,}2$ | $77{,}4 \pm 6{,}3$ |
| NAm, 0,2 | $85{,}3 \pm 8{,}1$ | $(21{,}0 \pm 1{,}2)^*$ |
| NAm, 1,0 | $87{,}2 \pm 9{,}0$ | |
| NAm, 2,0 | $89{,}6 \pm 8{,}4$ | |
| NAm, 5,0 | $92{,}5 \pm 8{,}7$ | $(15{,}4 \pm 0{,}8)^*$ |
| NAm, 15,0 | $86{,}3 \pm 7{,}4$ | |
| NAm, 20,0 | $84{,}4 \pm 6{,}8$ | |
| СТЗ, 5,0 | $16{,}5 \pm 1{,}0$ | $(9{,}1 \pm 0{,}7)^*$ |
| СТЗ, 5,0 + NAm, 0,2 | $(20{,}2 \pm 1{,}3)^*$ | |
| СТЗ, 5,0 + NAm, 1,0 | $(60{,}8 \pm 4{,}0)^*$ | |
| СТЗ, 5,0 + NAm, 2,0 | $(69{,}3 \pm 4{,}8)^*$ | |
| СТЗ, 5,0 + NAm, 5,0 | $(71{,}5 \pm 5{,}9)^*$ | $(17{,}5 \pm 0{,}9)^*$ |
| СТЗ, 5,0 + NAm, 15,0 | $(63{,}7 \pm 5{,}6)^*$ | |
| СТЗ, 5,0 + NAm, 20,0 | $(59{,}3 \pm 6{,}2)^*$ | |

*Вірогідність різниць у порівнянні з контролем, $p < 0{,}05$.

Таким чином, нами встановлено, що NAm може дозозалежно захищати бета-клітини від цитотоксичної дії СТЗ. За літературними джерелами, механізм індукованої СТЗ некротичної загибелі бета-клітин підшлункової залози, а також порушення функціонування клітин ендотелію, міокардіоцитів, реноцитів, клітин Шванна у відповідь на високі концентрації глюкози та розвиток оксидативного стресу при цукровому діабеті асоційовані з надактивацією полі(ADP-рибозо)полімерази (PARP) та істотним зниженням внутрішньоклітинного вмісту $NAD^+$ та ATP. Не виключено, що механізм цитопротекторної дії вітаміну PP може реалізовуватись через регуляцію процесів полі-ADP-рибозилювання білків, адже, з одного боку, NAm є конкурентним інгібітором PARP, а з іншого, як попередник біосинтезу $NAD^+$, — сприяє субстратному забезпеченню реакцій за участю PARP. Саме той факт, що найкраща цитопротекторна дія NAm реалізується при концентрації 5 ммоль/л, за якої він є ефективним інгібітором PARP, може підтвердити наше припущення [10]. Схожість захисної дії NAm у порівнянні з 3-амінобензамідом (більш специфічний інгібітор PARP, ніж NAm) є ще одним підтвердженням того, що вказаний ефект NAm здійснюється переважно через інгібування цього ензиму; останній відіграє істотну роль при реалізації різних програм загибелі клітин.

Раніше нами було продемонстровано, що інтенсифікація пошкодження ядерної ДНК головного мозку щурів при цукровому діабеті спричиняла активацію PARP, що посилювало клітинну утилізацію $NAD^+$, зниження рівня якого, у свою чергу, викликало падіння рівня ATP [2]. Це могло супроводжуватись значним порушенням ATP-залежних процесів та індукувати загибель нервових клітин. Виявлене нами коригування нікотинамідом функціонально-біохімічних показників головного мозку при цукровому діабеті тісно корелювало з відновленням внутрішньоклітинного пулу $NAD^+$, і тому не виключено, що цитопротекторна дія NAm на бета-клітини підшлункової залози значною мірою також може реалізовуватися через інтенсифікацію біосинтезу піридинових динуклеотидів, нормалізацію енергетичного обміну, а також посилення антиоксидантного захисту. Той факт, що NAm здатен запобігати загибелі бета-клітин при концентраціях значно вищих від тих, які є оптимальними для біосинтезу $NAD^+$ (понад 5 ммоль/л), та ефективного інгібування процесів полі-ADP-рибозилювання функціонально важливих протеїнів, може свідчити про існування й інших додаткових механізмів його цитопротекторної дії.

Відомо, що у відповідь на дію різних шкідливих чинників, у багатьох типах клітин відбувається індукція синтезу ряду сигнальних молекул, зокрема цитокінів, молекул адгезії, оксиду азоту тощо. Утворення даних медіаторів пошкодження знаходиться під контролем ядерного фактора $\kappa$B (NF-$\kappa$B). Було доведено: саме PARP-1, що є найбільш поширеним ензимом PARP у клітинних ядрах, діє як співактиватор в опосередкованій NF-$\kappa$B транскрипції генів. З огляду на це, достатньо логічними є повідомлення про те, що NAm володіє здатністю регулювати запальні процеси у тканинах, діючи найбільш імовірно як інгібітор ензиматичного ADP-рибозилювання функціонально важливих протеїнів. Було встановлено, що нікотинамід у терапевтичних дозах знижує утворення в острівцях підшлункової залози таких прозапальних цитокінів, як інтерлейкін 1$\beta$, інтерлейкін-6, інтерлейкін-8, TNF-$\alpha$ [11, 12]. В активованих трансформуючим фактором росту $\beta$1 (TGF-$\beta$1) зірчастих клітинах печінки NAm здатен гальмувати експресію прозапальних та профібротичних цитокінів (TGF-$\beta$2, IL-1$\beta$, TNF-$\alpha$ та хемотактичного протеїну-1 макрофагів) [13]. Показано також його здатність знижувати ступінь демієлінізації нервових волокон при експериментальному алергійному енцефаломієліті, у патогенезі якого істотну роль відіграють прозапальні цитокіни [14]. Позитивний ефект NAm на життєздатність бета-клітин, які зазнають впливів патогенних

чинників, крім того, може здійснюватись і через безпосередні зміни експресії такого стресорного білка, як p53, істотно гальмуючи її або ж запобігаючи $NAD^+$-залежному деацетилюванню p53, викликаному sir2$\alpha$ [15]. Однак конкретний механізм, за яким реалізується цитопротекторна дія NAm потребує більш глибокого подальшого вивчення.


1. *Maiese K., Morhan S. D., Chong Z. Z.* Oxidative stress biology and cell injury during type 1 and type 2 diabetes mellitus // Curr. Neurovasc. Res. – 2007. – **4**. – P. 63–71.
2. *Kuchmerovska T., Shymanskyy I., Donchenko G. et al.* Poly-ADP-ribosylation enhancement in brain cells nuclei is associated with diabetic neuropathy // J. Diabetes and Its Complicat. – 2004. – **18**, No 4. – P. 198–204.
3. *Akirav E., Kushner J. A., Herold K. C.* Beta-cell mass and type 1 diabetes: going, going, gone? // Diabetes. – 2008. – **57**, No 11. – P. 2883–2888.
4. *Purrello F., Vetri M., Gatta C. et al.* Effects of high glucose on insulin secretion by isolated rat islets and purified beta-cells and possibl role of glycosylation // Ibid. – 1989. – **38**. – P. 1417–1422.
5. *Polonsky K. S., Sturis J., Bell G.* Non-insulin-dependent diabetes mellitus: a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance // N. Engl. J. Med. – 1996. – **334**. – P. 777–783.
6. *Kahn S. E.* The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes // Diabetologia. – 2003. – **46**, No 1. – P. 3–19.
7. *Chong Z. Z., Li F., Maiese K.* Attempted Cell Cycle Induction in Post-Mitotic Neurons Occurs in Early and Late Apoptotic Programs Through Rb, E2F1, and Caspase 3 // Curr. Neurovasc. Res. – 2006. – **3**. – P. 25–39.
8. *De Felice F. G., Velasco P. T., Lambert M. P. et al.* Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine // J. Biol. Chem. – 2007. – **282**. – P. 11590–11601.
9. *Wang C., Ling Z., Pipeleers D.* Comparison of cellular and medium insulin and GABA content as markers for living beta-cells // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2005. – **288**, No 2. – P. E307–313.
10. *Uchigata Y., Yamamoto H., Kawamura A., Okamoto H.* Protection by superoxide dismutase, catalase and poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan – and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis // J. Biol. Chem. – 1982. – **257**. – P. 6084–6088.
11. *Moberg L., Olsson A., Berne C. et al.* Nicotinamide inhibits tissue factor expression in isolated human pancreatic islets: implications for clinical islet transplantation // Transplantat. – 2003. – **76**. – P. 1285–1288.
12. *Ungerstedt J. S., Blomback M., Soderstrom T.* Nicotinamide is a potent inhibitor of proinflammatory cytokines // Clin. and Exp. Immunol. – 2003. – **131**. – P. 48–52.
13. *Traister A., Breitman I., Bar-Lev E. et al.* Nicotinamide induces apoptosis and reduces collagen I and pro-inflammatory cytokines expression in rat hepatic stellate cells // Scand. J. Gastroenterol. – 2005. – **40**. – P. 1226–1234.
14. *Kaneko S., Wang J., Kaneko M. et al.* Protecting axonal degeneration by increasing nicotinamide adenine dinucleotide levels in experimental autoimmune encephalomyelitis models // J. Neurosci. – 2006. – **26**. – P. 9794–9804.
15. *Luo J., Nikolaev A. Y., Imai S. et al.* Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress // Cell. – 2001. – **107**. – P. 137–148.



*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна*
*НАН України, Київ*
*Національний медичний університет*
*ім. О. О. Богомольця, Київ*
*Інститут експериментальної патології,*
*онкології і радіобіології ім. Р. Е. Кавецького*
*НАН України, Київ*



*Надійшло до редакції 28.01.2010*

**I. O. Shymanskyy,** Corresponding Member of the NAS of Ukraine **G. V. Donchenko, I. M. Trofimova, N. M. Gurina, S. M. Suprun, A. P. Klimenko, E. V. Ovchynnikova, T. M. Kuchmerovska**

## Protective effect of nicotinamide on pancreatic beta-cells

*We have investigated the influence of nicotinamide (NAm) on the survival of isolated rat pancreatic beta-cells in vitro. It was found that the exposure of beta-cells to various concentrations of nicotinamide strongly protects them against cytotoxic effects of streptozotocin that results in their better time-dependent survival. Most likely, these effects can be associated with the direct modulatory action of NAm on important effector mechanisms involved in cell death, including PARP-dependent processes, or/and indirectly, through metabolic and antioxidant effects of the compound.*