

УДК 616.370-008.64-616.37

Н. М. ЛУГІНІЧ, І. В. ГЕРУШ, І. М. ЯРЕМІЙ, Н. В. ДАВИДОВА

Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет»  
Театральна пл., 2, Чернівці, 58002

## **ВПЛИВ 14-ТИ ДОБОВОГО ВВЕДЕННЯ МЕЛАТОНІНУ НА МЕТАБОЛІЗМ ГЛУТАТІОНУ В ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ЗА АЛОКСАНОВОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ**

Досліджували білих безпородних статевозрілих щурів-самців, в крові яких визначали рівень глюкози, а в печінці вміст відновленого глутатіону (GSH), активність глутатіонпероксидази (GPx), глутатіонредуктази (GR), глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (G-6-PD) і глутатіон-S-трансферази (GST). Результати досліджень показали, що в печінці щурів при ЦД спостерігалось зниження вмісту GSH, а також активності глутатіон-залежних ензимів GPx, G-6-PD та GST порівняно з тваринами контрольної групи. Введення мелатоніну інтрагастрально упродовж 14 днів спричиняло нормалізуючий вплив на рівень глюкози в крові, вміст GSH та активність GPx в печінці щурів при експериментально індукованому алоксановому ЦД. Мелатонін в дозі 10 мг/кг сприяє нормалізації рівня глюкози в крові та деяких показників глутатіонової системи антиоксидантного захисту в печінці щурів при експериментально індукованому алоксановому ЦД, що свідчить про його ефективну антиоксидантну роль в цьому органі.

*Ключові слова: цукровий діабет, мелатонін, алоксан, глутатіон, антиоксидантна система*

Цукровий діабет (ЦД) є одним з найпоширеніших ендокринних порушень обміну речовин, який має серйозні медичні наслідки з істотним впливом на якість життя. Число хворих на ЦД зростає в геометричній прогресії. Декілька факторів, які можуть пояснити механізми, пов'язані з патологічними і функціональними змінами діабетичного ушкодження печінки, включають: резистентність до інсуліну, оксидативний стрес і перенавантаження ендоплазматичного ретикулуму [1].

Глутатіон є кофактором багатьох ензимів, які беруть участь в детоксикації активних форм кисню, а його дефіцит призводить до прогресування діабету [2].

Мелатонін – високоефективна та функціонально різноманітна молекула, що протидіє вільнорадикальним процесам. Він зарекомендував себе як один з найефективніших антиоксидантів, що не тільки зв'язує гідроксильні радикали, але і підвищує активність антиоксидантних ензимів [3]. З літературних даних відомо, що мелатонін може відігравати певну роль в метаболізмі глюкози. Прийом всередину мелатоніну має захисний ефект при виникненні цукрового діабету у щурів, схильних до цього захворювання [4, 5].

Зважаючи на вищезазначене, дослідження проведено з метою вивчення ролі мелатоніну як потужного антиоксиданта на систему глутатіону в печінці в алоксан-індукованих діабетичних щурів.

### **Матеріал і методи досліджень**

Досліди проведені на білих безпородних статевозрілих щурах-самцях з масою тіла – 0,15-0,18 кг. Цукровий діабет був викликаний внутрішньоочеревинним введенням 5% розчину моногідрату алоксану в дозі 150 мг/кг [6]. Тварини були розділені на підгрупи: 1) контрольні тварини; 2) тварини з ЦД (базальна глікемія 15,7-26,4 ммоль/л); 3) тварини з ЦД, яким інтрагастрально вводили мелатонін (Merck, Німеччина) в дозі 10 мг/кг о 8<sup>00</sup> щодня упродовж 14 днів.

Кров у щурів отримували шляхом декапітації під легким ефірним наркозом з дотриманням вимог загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених на Першому національному конгресі України з біоетики (Київ, 2001), Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та науковою метою (Страсбург, 1986). Печінку швидко вирізали, промивали в охолодженому льодом

фізіологічному розчині, промокали, заморожували в рідкому азоті і зберігали при температурі -20 ° C до використання.

В крові рівень глюкози визначали глюкозооксидазним методом з використанням стандартного аналітичного набору „Філісіт-Діагностика” (Україна). В печінці визначали вміст відновленого глутатіону (GSH) [7], активність глутатіонпероксидази [КФ 1.11.1.9] (GPX) [8], глутатіонредуктази [К.Ф.1.6.4.2] (GR) [9], глюкозо-6-фосфатдегідрогенази [КФ 1.1.1.49] (G-6-PD) [10] і глутатіон-S-трансферази [КФ 2.5.1.18] (GST) [11].

Варіаційно-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів *Microsoft Excel* з використанням непараметричних методів варіаційної статистики: розрахунок середніх значень (M), похибки середніх значень (m), U-критерію Уїлкоксона. Вірогідною вважали різницю при  $p < 0,05$ .

### Результати досліджень та їх обговорення

Встановлено, що глутатіонова система є важливим компонентом в захисті від оксидного ушкодження печінки при експериментальному алоксановому ЦД. У щурів з діабетом підвищувався рівень глюкози крові в 3 рази ( $p < 0,05$ ) порівняно з щурами контрольної групи. Після двох тижнів введення мелатоніну діабетичним щурам спостерігалось зниження рівня глюкози в крові на 55% ( $p < 0,05$ ) порівняно з діабетичними щурами, але він не досяг показника щурів контрольної групи (рис. 1).

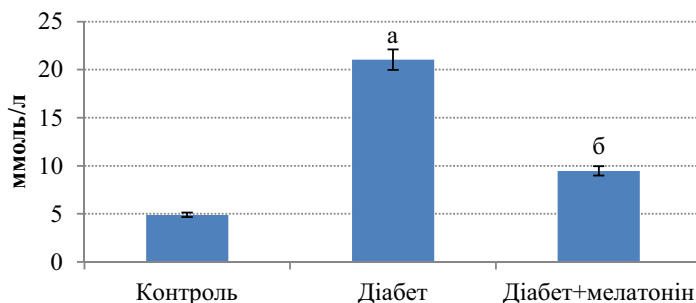


Рис. 1. Вплив введення мелатоніну на рівень глюкози в крові щурів за умов алоксанового ЦД

Примітка. <sup>a</sup> –  $p < 0,05$  різниця вірогідна порівняно з тваринами контрольної групи, <sup>б</sup> –  $p < 0,05$  різниця вірогідна порівняно з алоксан-діабетичною групою.

В печінці тварин на ранній стадії експериментального ЦД спостерігається активація оксидативного стресу. Необхідно відмітити, що при діабеті також знижується ефективність антиоксидантів [1].

В печінці щурів спостерігали зниження вмісту GSH на 24%, при ЦД (група 2) порівняно з щурами контрольної групи (група 1). Введення мелатоніну сприяло підвищенню вмісту GSH на 12 % порівняно із щурами, хворими на ЦД (рис. 2). Глутатіон є найбільш важливим внутрішньоклітинним сульфо-антиоксидантом, основним фактором, що визначає окислювально-відновний стан сульфо/дисульфідної системи і критичним регулятором імунної функції, клітинного старіння, апоптозу і життєво важливих окислювально-відновних чутливих сигнальних шляхів. Адекватні рівні GSH мають важливе значення для здійснення детоксикації ксенобіотиків та ендогенних токсинів, для біосинтезу багатьох важливих біомолекул, а також для захисту всіх клітин від оксидативного стресу [2].

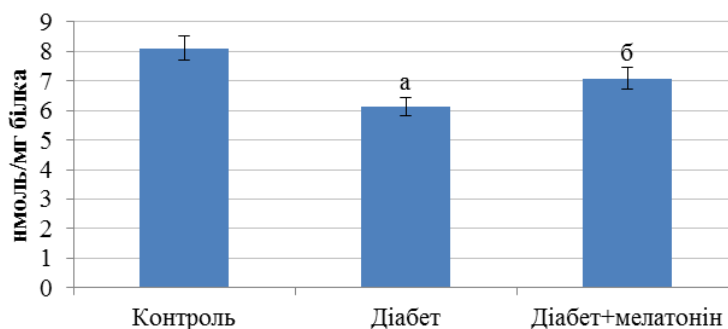


Рис. 2. Вплив введення мелатоніну на рівень глутатіону в печінці щурів за алоксанового ЦД

Примітка. <sup>a</sup> –  $p < 0,05$  різниця вірогідна порівняно з щурами контрольної групи, <sup>б</sup> –  $p < 0,05$  різниця вірогідна порівняно з алоксан-діабетичною групою.

Ми виявили зміни в діяльності антиоксидантних ензимів глутатіонової системи в печінці щурів відбувалося достовірно зниження активностей GP<sub>x</sub> на 13%, G-6-PD на 19% та GST на 16% при ЦД (група 2) порівняно з щурами контрольної групи (група 1). Введення мелатоніну сприяло підвищення активності GP<sub>x</sub> на 14% порівняно із щурами, хворими на ЦД (таблиця).

Таблиця

Вплив введення мелатоніну на активність ензимів системи глутатіону в печінці щурів за алоксанового ЦД (M±m)

Назва групи	Контроль, n=27	Діабет, n=19	Діабет+мелатонін, n=18
GP <sub>x</sub> , нмоль/хв× мг білка	172,57±8,63	149,87±8,48 <sup>a</sup>	171,59±10,94 <sup>б</sup>
GR, нмоль/хв× мг білка	5,8±0,4	4,66±0,55	5,78±0,75
G-6-PD, нмоль/хв× мг білка	2,82±0,14	2,29±0,12 <sup>a</sup>	2,41±0,14
GST, нмоль/хв× мг білка	62,5±1,97	52,6±0,89 <sup>a</sup>	58,82±0,82

Примітка. <sup>a</sup> –  $p < 0,05$  різниця вірогідна порівняно з контрольною групою, <sup>б</sup> –  $p < 0,05$  різниця вірогідна порівняно з алоксан-діабетичною групою.

При експериментальному ЦД внаслідок хронічної гіперглікемії спостерігається високий оксидативний стрес, який виснажує активність антиоксидантних ензимів і тим самим сприяє утворенню вільних радикалів [12, 13]. Гіперглікемія і цукровий діабет також асоціюється з низькими рівнями глутатіону в крові тварин з ЦД [14].

ЦД і його ускладнення супроводжуються збільшенням продукування активних форм кисню і порушенням тілового окислювально-відновного гомеостазу. Швидкість утворення активних форм кисню залежить від метаболічного статусу клітини, оскільки гіперглікемія підвищує вміст супероксидів. Поряд із цим збільшується швидкість ензимативного відновлення глюкози до сорбіту, а також, супутнє зниження НАДФН та вмісту GSH [2].

В даний час, коли антиоксиданти знаходяться в центрі уваги, мелатонін є одним з кандидатів для монотерапії, в якості можливого попередника виникнення хвороб, які безпосередньо пов'язані з оксидативним стресом і запаленням, або як допоміжний засіб для інших терапевтичних агентів. Він пригнічує пероксидне окиснення ліпідів і впливає на діяльність антиоксидантних ензимів. Захист печінки від оксидативного стресу може також частково сприяти гіпоглікемічному ефекту мелатоніну у щурів, хворих на ЦД.

Введення мелатоніну призводить до швидкого зростання його концентрації в крові. Оскільки мелатонін має як виражені ліпофільні, так і гідрофільні властивості, він швидко проходить через всі біологічні мембрани і проникає в клітини та їх субклітинні компартменти. Такий внутрішньоклітинний розподіл мелатоніну дозволяє йому зменшити окисне пошкодження у всій клітині. Завдяки цьому мелатонін має перевагу над деякими іншими антиоксидантами, що проникають в клітини повільніше [13].

Існує незалежний зв'язок між зниженням секреції мелатоніну і підвищеним ризиком розвитку цукрового діабету 2 типу [4]. Це дослідження встановлює основу для необхідності антиоксидантної терапії в поєднанні з гіпоглікемічними препаратами в лікуванні ЦД.

### Висновки

Встановлено нормалізуючий вплив введення мелатоніну на рівень глюкози в крові, вміст GSH та активність GP<sub>x</sub> в печінці щурів при експериментально індукованому алоксановому ЦД, що свідчить про його ефективну антиоксиданту роль в цьому органі.

Мелатонін може бути перспективним агентом для захисту функцій печінки щурів з алоксановим ЦД, що спонукає до вивчення можливості використання цієї молекули, як допоміжного засобу у терапії, через свій антиоксидантний та антигіперглікемічний ефект, що відкриває дуже широке поле дослідження.

1. *Role of stem cells during diabetic liver injury* / Y. Wan, J. Garner, N. Wu [et all.] // *Journal Cell Molecular Medicine*. — 2016. — № 20. — P. 195—203.
2. *Sekhar R.V. Glutathione synthesis is diminished in patients with uncontrolled diabetes and restored by dietary supplementation with cysteine and glycine* / R.V. Sekhar, S.V. McKay, S.G. Patel // *Diabetes Care*. — 2011. — № 34. — P. 162—167.
3. *Fundamental issues related to the origin of melatonin and melatonin isomers during evolution: relation to their biological functions* / D. X. Tan, X. Zhen, J. Kong [et all.] // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2014. — № 15. — P. 15858—15890.
4. *Melatonin secretion and the incidence of type 2 diabetes* / C. J. McMullan, E.S. Schernhammer, E.B. Rimm [et all.] // *Journal of the American Medical Association*. — 2013. — № 309. — P. 1388—1396.
5. *Сучасні уявлення про патогенез цукрового діабету першого типу та роль мелатоніну* / І. Ф. Мещишен, І.В. Геруш, І. М. Яремій, О. Ю. Кушнір. — Чернівці: Медичний університет, 2014. — 128 с.
6. *Treatment of alloxan-induced diabetic rats with metformin or glitazones is associated with amelioration of hyperglycaemia and neuroprotection* / O. Akinola, M. Gabriel, A. Suleiman [et all.] // *The Open Diabetes Journal*. — 2012. — № 5. — P. 8—12.
7. *Карпищенко А. И. Глутатионзависимая антиоксидантная система в некоторых тканях крыс в условиях острого отравления дихлорэтаном* / А. И. Карпищенко, С. И. Глушков, В. В. Смирнов // *Токсикологический вестник*. — 1997. — № 3. — С. 17—23.
8. *Власова С. Н. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей* / С. Н. Власова, Е. И. Шабунина, И. А. Персегина // *Лаб. дело*. — 1990. — № 8. — С. 19—22.
9. *Beutler E. Effect of Flavin Compounds on Glutathione Reductase Activity: In Vivo and In Vitro Studies* / E. Beutler // *The Journal of Community Informatics*. — 1969. — № 48. — P. 1957—1966.
10. *Kornberg A. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase* / A. Kornberg, B. L. Horecker // *Methods in Enzymology*. — New York: Academic Press, 1955. — Vol. 1 — P. 323.
11. *The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver* / W. H. Habig, M. J. Pabs, G. Fleischner [et all.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1974. — № 71. — P. 38794—3882.
12. *Effect of melatonin intake on oxidative stress biomarkers in male reproductive organs of rats under experimental diabetes* [Електронний ресурс] / M. G. Gobbo, C. F. Pereira Costa, D. G. Humberto Silva [et all.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. — 2015. — Article ID 614579. — P. 11. — Режим доступу до журн.: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/614579>.
13. *Melatonin attenuates contrast-induced nephropathy in diabetic rats: the role of interleukin-33 and oxidative stress* / O. A. Onk, H.S. Erol, T.A. Ayazoglu [et all.] // *Mediators of Inflammation*. — 2016. — Article ID 9050828. — P. 10. — Режим доступу до журн.: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9050828>.
14. *Jain S. Hydrogen sulfide upregulates glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, glutamatecysteine ligase modifier subunit, and glutathione and inhibits interleukin-1beta secretion in monocytes exposed to high glucose levels* / S. Jain, L. Huning, D. Micinski // *Metabolic Syndrome and Related Disorders*. — 2014. — № 12. — P. 299—302.

*N. M. Luhinich, I. V. Gerush, I. M. Yaremiy, N. V. Davydova*

Higher State Educational Establishment of Ukraine "Bukovinian State Medical University" (BSMU)

#### THE INFLUENCE OF 14 DAYS INTRODUCTION OF MELATONIN ON THE METABOLISM OF GLUTATHION IN THE LIVER OF ALLOXAN DIABETIC RATS

Diabetes mellitus (DM) is one of the most prevalent endocrine disorders in the world. Glutathione is a cofactor of many enzymes involved in the detoxification of active forms of oxygen and its deficiency leads to the progression of diabetes. Published data show that melatonin may play a role in glucose metabolism. Introduction of melatonin inhibits peroxidation of lipids and changes in the activity of antioxidant enzymes.

Therefore, the purpose of study was to evaluate effect of melatonin on the state of the glutathione system in the liver of rats under conditions of aloxane diabetes mellitus.

Experiments were conducted on white outbred sexually mature male rats. The glucose level was measured in the blood. In the liver, the content of reduced glutathione (GSH), activity of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) and glutathione-S-transferase (GST).

The results of our studies showed that in the liver of rats with diabetes, there was a decrease in the content of GSH and the activity of glutathione-dependent enzymes GP<sub>x</sub>, G-6-PD and GST compared to control rats. The introduction of melatonin intragastrically over a period of 14 days had a normalizing effect on blood glucose level, GSH content and activity of GP<sub>x</sub> in the liver of rats in experimentally alloxane-induced DM.

Melatonin in the dose of 10 mg/kg contributes to the normalization of blood glucose level and some indicators of glutathione antioxidant defense system in the liver of rats in experimentally alloxane-induced DM, which testifies that its effective antioxidant role in this organ.

*Key words: diabetes mellitus, melatonin, alloxan, glutathione, antioxidant system*

Рекомендує до друку  
В. В. Грубінко

Надійшла 07.09.2018

УДК: 573:575:57.022: 577+57.042

О. Г. НЕСТЕРЕНКО, С. В. ЛІТВІНОВ, Н. М. РАШИДОВ

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України  
вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03143

### **АНАЛІЗ АКТИВНОСТІ LTR-РЕТРОТРАНСПОЗОНІВ РОСЛИН ГОРОХУ ПІД ВПЛИВОМ АБІОТИЧНИХ СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ**

Метою роботи було провести порівняльний аналіз змін ДНК у відповідь на стреси різної природи та їх комбінації (осмотичний стрес, іонізуюче опромінення, нагрівання) у геномі гороху на основі дослідження повторюваних елементів- LTR шляхом детекції появи нових ампліконів. Дослідження показали, що різні види стресу та його комбінації можуть активувати ретротранспозони рослин і привести до їх проліферації, зруйнувавши епігенетичний сайленсінг. Найактивніше на стрес реагували ретротраспозони за використання праймерів іPBS2074 та CYCLOP. Серед стресових чинників найефективнішими для активації транспозиції ретротранспозонів виявилися іонізуюче опромінення у високих (20–25 Гр) та низьких (5 Гр) дозах у поєднанні з засоленням та без нього, а також нагрівання та осмотичний шок.