

УДК 616.379 – 008.64:577.114

Мещишен І.Ф., Кушнір О.Ю., Яремій І.М., Мещишен І.-С. В.

ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ НА ОКРЕМІ ПОКАЗНИКИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ З АЛОКСАНОВИМ ДІАБЕТОМ ЗА УМОВ ЦІЛОДОБОВОЇ ТЕМРЯВИ

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

В статті показано, що у щурів, які перебували за умов цілодобової темряви, вміст відновленого глутатіону (G-SH), активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та глутатіонпероксидази - в печінці були вищими порівняно з показниками інтактних щурів. Встановлено, що у діабетичних щурів за умов цілодобової темряви, порівняно з показниками інтактних тварин, відбувалися зміни рівня базальної глікемії, вмісту відновленого глутатіону (G-SH), активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та глутатіонпероксидази - в печінці. Виявлено, що за умов формування явного цукрового діабету в щурів відбувалося зростання рівня базальної глікемії та зниження вмісту відновленого глутатіону (G-SH), активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази і глутатіонпероксидази - в печінці. Проаналізований ріст вмісту відновленого глутатіону (G-SH), активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та глутатіонпероксидази - в печінці щурів з латентним діабетом (стан нормоглікемії) порівняно з відповідними показниками інтактних тварин. Уведення діабетичним щурам мелатоніну з розрахунку 10 мг/кг маси впродовж 7-ми днів сприяло нормалізації вище зазначених показників.

Ключові слова: мелатонін, алоксановий діабет, глутатіонова система, печінка, щури.

Стаття є фрагментом планової науково-дослідницької роботи кафедри медичної біології, генетики та гістології Буковинського державного медичного університету (м. Чернівці) «Участь структур головного мозку й ендокринних залоз у формуванні циркадіанних ритмів та часовій організації фізіологічних функцій органів у ссавців» (державна реєстрація № 0109U003912).

Вступ

У людей спостерігається різниця між рівнями синтезу та секреції денного та нічного мелатоніну [14].

Відомо, що екзогенний мелатонін захищає цільові органи за умов діабетичного статусу. Адже експериментальний стрептозотоциновий діабет призводить до зниження рівнів мелатоніну в підшлунковій залозі. Уміст кортикостероїдів в плазмі крові збільшується в діабетичних щурів, а їх щоденний профіль не є ритмічним. Таким чином, нижча амплітуда ритму мелатоніну в цільових органах, що індукується експериментальним ЦД, може спричинити десинхронізацію щоденних ритмів і знизити антиоксидантну ємність тканин [15]. У 2/3 пацієнтів із ЦД типу 1, незалежно від сезону року, величина мелатонін ніч / мелатонін день виявляється менше 1,0 і коливається від 0,4 до 0,7 [3].

Відомо, що пінеалектомія, так само як гіпофункція пінеальної залози зумовлена постійним освітленням, веде до зниження синтезу та секреції мелатоніну, що спричиняє порушення чутливості до інсуліну та зменшення експресії гену транспортеру глюкози GLUT4 [12, 14].

Оскільки активні радикали кисню опосередковують цитотоксичні та діабетогенні властивості алоксану і враховуючи, що мелатонін є ефективним перехоплювачем гідроксильних радикалів [4,9], встановлено, що мелатонін здатний захищати у щурів від алоксанпровокованого діабету і попереджувати, спричинені діабетом, зменшення функціонування антиоксидантної глутатіонової системи, а також знижувати рівень гідроксильних радикалів у кролів [6, 7, 13]. Мелатонін, як відомо [1], має як хронобіологічну, так і анти-

оксидантну дію.

Метою

З'ясувати вплив мелатоніну на рівень базальної глікемії (БГ), відновленого глутатіону (G-SH), глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6фДГ) та глутатіонпероксидази (ГП) в печінці щурів з алоксановим цукровим діабетом (ЦД) за умов цілодобової темряви.

Матеріали та методи

Експерименти проведені на статевозрілих самцях безпородних білих щурів масою 0,18 - 0,20 кг. Алоксановий діабет [2], викликали шляхом уведення щурам 5%-го розчину алоксану моногідрату внутрішньоочередовинно в дозі 170 мг/кг маси. Кров для дослідження відбирали з хвостової вени. Визначення рівня БГ проводили за допомогою приладу One Touch Ultra Easy (виробник "Johnson & Johnson", США). На третю (критичну) добу спостерігалась загибель \approx 50% діабетичних щурів. Дослідних тварин було розділено на групи: 1) контроль (щури, які перебували за умов штучного рівнодення) (С:Т=12:12); 2) щури, які перебували за умов цілодобової темряви (С:Т=0:24); 3) щури з явним ЦД (БГ \geq 8,0 ммоль/л) (С:Т=0:24); 4) щури з явним ЦД, яким з 5-ої доби після введення алоксану впродовж 7-ми діб 0^{00} внутрішньоочередовинно вводили мелатонін з розрахунку 10 мг/кг маси (С:Т=0:24); 5) щури з латентним ЦД (БГ \leq 6,9 ммоль/л) (С:Т=0:24); 6) щури з латентним ЦД, яким аналогічно вводили мелатонін (С:Т=0:24). Тварин забирали шляхом декапітації на 12-ту добу від початку експерименту у відповідності до етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Ки-

ів, 2000), що узгоджується з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей. У супернатанті, отриманому після центрифугування 5%-го гомогенату печінки при 900g, визначали активності ферментів за стандартними методиками [8, 10].

Статистичну обробку результатів дослідження проводили за Стьюдентом. Для визначення адекватного методу статистичної оцінки середньої різниці між групами дослідження проведена попередня перевірка розподілу величин у вибірках. Згідно критерію Shapiro-Wilk, який використовують з метою оцінки нормальності розподілу у вибірках об'ємом $n \leq 50$, для всіх вибірок не отримано даних про відхилення розподілу у вибірках від нормального ($p > 0,05$). Враховуючи

наведені дані, застосування критерію Стьюдента вважали достатнім для отримання валідних висновків. Для підвищення надійності висновків паралельно використали непараметричний критерій порівняння Mann-Whitney (Манні-Вітні), який показав подібні результати до обрахунків за допомогою критерію Стьюдента щодо величини p . Достатнім рівнем вірогідності розбіжностей вважали $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення

Згідно отриманих результатів (таблиця 1), введення мелатоніну впродовж 7-ми діб призвело до нормалізації рівня БГ в групі тварин із явним ЦД, що вказує на гіпоглікемізувальну дію останнього.

Таблиця 1
Рівень глюкози в капілярній крові діабетичних щурів за умов цілодобової темряви, ммоль/л ($\bar{x} \pm Sx$, $n=6$)

Показники	Групи	Рівень глюкози на 4-ту добу (до введення засобів корекції)	Рівень глюкози (на 12-ту добу після введення алоксану)
Контроль (С:Т=12:12)		5,3±0,33	5,4±0,51
Контроль (С:Т=0:24)		5,4±0,38	5,4±0,42
Явний цукровий діабет (С:Т=0:24)		12,4±1,54 ^a	14,7±2,73 ^a
Явний цукровий діабет + мелатонін, 10 мг/кг маси (С:Т=0:24)		12,8±0,86 ^a	5,6±1,24 ^{b,d}
Латентний цукровий діабет (С:Т=0:24)		5,3±0,25 ^b	5,7±0,56 ^b
Латентний цукровий діабет + мелатонін, 10 мг/кг маси (С:Т=0:24)		5,2±0,54 ^b	5,0±0,41 ^{b,c}

Примітка: 1. a, b, c, d - зміни вірогідні ($p \leq 0,05$). 2. a - стосовно контролю; b - стосовно явного цукрового діабету; c - стосовно латентного цукрового діабету; d - в межах групи стосовно 4-ї доби.

Таблиця 2
Вплив мелатоніну на окремі показники глутатіонової системи печінки діабетичних щурів за умов цілодобової темряви ($\bar{x} \pm Sx$, $n=6$)

Показники	Групи	Глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназа, нмоль / хвЧмг	Глутатіон відновлений, мкмоль/г тканини	Глутатіон пероксидаза, нмоль/ хвЧмг
Контроль (С:Т=12:12)		6,6±0,18	7,1±0,42	152,8±12,4
Контроль (С:Т=0:24)		9,5±0,20 ^a	9,3±0,50 ^a	194,1±11,3 ^a
Явний цукровий діабет (С:Т=0:24)		5,0±0,38 ^a	5,3±0,17 ^a	122,2±8,0 ^a
Явний цукровий діабет + мелатонін (С:Т=0:24)		6,7±0,45 ^b	7,0±0,40 ^b	150,1±7,24 ^b
Латентний цукровий діабет (С:Т=0:24)		13,8±0,42 ^{a,b}	9,7±0,42 ^{a,b}	188,0±11,0 ^{a,b}
Латентний цукровий діабет + мелатонін (С:Т=0:24)		7,0±0,15 ^{b,c}	7,0±0,32 ^{b,c}	150,0±6,0 ^{b,c}

Примітка: 1. a, b, c - зміни вірогідні ($p \leq 0,05$). 2. a - стосовно контролю; b - стосовно явного цукрового діабету; c - стосовно латентного діабету.

У щурів (таблиця 2), які перебували за умов цілодобової темряви, вміст G-SH, активність Г-6-фДГ та ГП були відповідно на 31%, 44% та 27% вищими порівняно з контролем (С:Т=12:12). Відомий [5, 11] стимулювальний вплив ендогенного мелатоніну (гіперпродукція ендогенного мелатоніну за умов постійної темряви) на експресію мРНК часових генів Clock, Per-1, активність Г-6-фДГ і секрецію лептину.

В печінці щурів з явним ЦД відбулося зниження вмісту G-SH на 25% порівняно з показниками контролю. Зниження вмісту G-SH у щурів із явним ЦД, найімовірніше, зумовлене посиленням його використання для знешкодження в тканинах надлишку активних форм кисню, які утворюються в умовах гіперглікемії.

Активність Г-6-фДГ в крові щурів з явним ЦД була на 25% нижчою ніж в контролі. Зниження активності Г-6-фДГ при явному ЦД, ймовірно, пов'язано із: зменшенням кількості глюкози у клітині, зниженням активності гексокінази і глікогенсинтази, які забезпечують утворення Г-6-Ф, а також з абсолютним дефіцитом інсуліну (інсулін активує Г-6-фДГ). Дефіцит НАДФН₂ при ЦД розвивається також і внаслідок підсилення його витрат при активації поліолового шляху метаболізму глюкози [3].

Не виключено також, що за умов формування алоксанового ЦД у щурів пригнічується біосинтез глутатіону. Активність ГП, яка використовує глутатіон, відновлений для знешкодження пероксиду водню й інших гідропероксидів, при цьому

була на 20% нижчою, ніж в щурів контролі.

Підвищення вмісту G – SH (на 37% порівняно з показниками контролю) у щурів з латентним ЦД ймовірно відбувається за рахунок його посиленої регенерації з окисненої форми. У печінці щурів з латентним ЦД активності Г-6-фДГ і ГП були на 110% і 20% вищими ніж відповідні показники у контрольних тварин (С:Т=12:12). Підвищення активності Г-6-фДГ при ЦД типу 1 із збереженою нормоглікемією, ймовірно, є компенсаторною реакцією організму, спрямованою на зменшення активних радикалів оксигену (АРО), оскільки відновні еквіваленти НАДФН₂, які утворюються в цій реакції, використовуються для регенерації відновленого глутатіону з окисненої форми під дією НАДФН-залежної глутатіонредуктази. Відновлений глутатіон знешкоджує АРО як безпосередньо, так і через глутатіонпероксидазу.

Уведення діабетичним тваринам мелатоніну сприяло нормалізації всіх досліджуваних показників крові щурів. Таке підвищення під впливом мелатоніну активності Г-6-фДГ у печінці щурів може бути зумовлено як збільшенням кількості субстрату для Г-6-фДГ (стимулювання надходження глюкози у клітини та її фосфорилування), так і прямою дією [11].

Висновок

Отже, за умов явного та латентного цукрового діабету на фоні постійної темряви екзогенний мелатонін нормалізує активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази і глутатіонпероксидази, що супроводжується підвищенням в печінці щурів з явним цукровим діабетом вмісту відновленого глутатіону – одного з основних ендогенних антиоксидантів.

Реферат

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В ПЕЧЕНИ КРЫС С АЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ В УСЛОВИЯХ КРУГЛОСУТОЧНОЙ ТЬМЫ

Мецишен И.Ф., Кушнир А.Ю., Яремий И.Н., Мецишен И.-С. В.

Ключевые слова: мелатонин, аллоксановый диабет, глутатионовая система, печень, крысы.

В статье показано, что у крыс, которые находились в условиях круглосуточной тьмы, уровень восстановленного глутатіона (G-SH), активность глюкозо-6-фосфатдегідрогеназы и глутатионпероксидазы - в печени были выше в сравнении с показателями интактных крыс. Установлено, что у диабетических крыс в условиях круглосуточной тьмы, в сравнении с показателями интактных крыс, происходили изменения уровня базальной гликемии, уровня восстановленного глутатіона (G-SH), активности глюкозо-6-фосфатдегідрогеназы и глутатионпероксидазы - в печени. Определено, что в условиях формирования явного сахарного диабета у крыс происходил рост уровня базальной гликемии и снижение концентрации восстановленного глутатіона (G-SH), активности глюкозо-6-фосфатдегідрогеназы и глутатионпероксидазы - в печени. Проанализированы рост концентрации восстановленного глутатіона (G-SH), активности глюкозо-6-фосфатдегідрогеназы и глутатионпероксидазы - в печени крыс с латентным диабетом (состояние нормогликемии) в сравнении с показателями интактных крыс. Введение диабетическим крысам мелатонина из расчета 10 мг/кг массы на протяжении 7-ми дней способствовало нормализации выше указанных показателей.

Література

1. Мелатонин в норме и патологии / Под ред. Ф.И. Комарова, С.И. Рапопорта, Н.К. Малиновской, В.Н. Анисимова. – М.: ИД Мед-практика – М., 2004. – 524 с.
2. Пальчикова Н.А. Особенности течения экспериментального сахарного диабета при введении в рацион животных природного инсулинового комплекса / Н.А. Пальчикова, Ю.В. Лутков, Л.А. Обухова [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2007. – Т. 124, № 2. – С. 114-118.
3. Турчина С.И. Характер продукции мелатонина у подростков, больных сахарным диабетом / С.И. Турчина, Е.А. Будрейко // Проблемы эндокринной патологии. – 2008. – № 1. – С. 31-37.
4. Noyan T. Antioxidant effects of Pentoxifylline and melatonin in alloxan-induced diabetic mice / T. Noyan, A. Sadik Yalcinkaya, M. Ramazan Şekeroğlu [et al.] // Turkish Journal of Biochemistry. – 2004. – V. 29, № 4. – P. 268-272.
5. Herichova I. Effect of streptozotocin-induced diabetes on daily expression of per2 and dbp in the heart and liver and melatonin rhythm in the pineal gland of Wistar rats / I. Herichova, M. Zeman, K. Stebelova [et al.] // Molecular and Cellular Biology. – 2005. – V. 270. – P. 223-229.
6. Armagan A. Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat testis / A. Armagan, E. Uz, H.R. Yilmaz [et al.] // Asian Journal of Andrology. – 2006. – V. 8, № 5. – P. 595-600.
7. Guven A. Effects of melatonin on streptozotocin-induced diabetic liver injury in rats / A. Guven, O. Yavuz, M. Cam [et al.] // Acta Histochemica. – 2006. – V. 108, № 2. – P. 85-93.
8. Gerush I.V. Stan peroksydnogo oksylenna lipidiv i aktivnist fermentiv antioksidantnoji systemy pechinky za umov gostrogo hepatitu ta dii nastojky Echinacea Purpurea / I.V. Gerush // Clin.Pharm. – 2001. – V. 5, №4. – P. 49-52.
9. Klepac N. Effects of melatonin on plasma oxidative stress in rats with streptozotocin induced diabetes / N. Klepac, Z. Rudes, R. Klepac // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2006. – V. 60. – P. 32-35.
10. Mannervick B. Glutathione peroxidase / B. Mannervick // Methods Enzymol. – 1985. – № 113. – P. 490-495.
11. Alonso-Vale M.I. Melatonin and the circadian entrainment of metabolic and hormonal activities in primary isolated adipocytes / M.I. Alonso-Vale, S. Andreotti, P.Y. Mukai [et al.] // Journal of Pineal Research. – 2008. – V. 45, №4. – P. 422-429.
12. Peschke E. Melatonin and type 2 diabetes - a possible link? / E. Peschke, I. Stumpf, I. Bazwinsky [et al.] // Journal of Pineal Research. – 2007. – V. 42, № 4. – P. 350-358.
13. Winiarska K. Melatonin attenuates diabetes-induced oxidative stress in rabbits / K.Winiarska, T. Fraczyk, D. Malinska [et al.] // Journal of Pineal Research. – 2006. – V. 40, № 2. – P. 168-176.
14. Peschke E. Melatonin, endocrine pancreas and diabetes / E. Peschke // Journal of Pineal Research. – 2008. – V. 44. – P. 26-40.
15. Stebelova K. Diabetes induces changes in melatonin concentrations in peripheral tissues of rat / K. Stebelova, I. Herichova, M. Zeman // Neuroendocrinology Letters. – 2007. – V. 28, № 2. – P. 159-165.

Summary

EFFECT OF MELATONIN ON SOME INDICATORS OF ANTIOXIDANT PROTECTION IN LIVER OF RATS WITH ALLOXAN-INDUCED DIABETES IN TWENTY-FOUR-HOUR DARKNESS

Meshchysheh I.F., Kushnir O.Yu., Yaremii I.M., Meshchysheh I.S.V.

Key words: melatonin, alloxan-induced diabetes, glutathione system, liver, rats.

Melatonin production is inhibited when there is an increase in the light received by the retina while production is stimulated when there is a decrease in the light received by the retina (darkness stimulates production). Hence, during evenings, as the light received by the retina reduces melatonin production sets in, this evening onset is called the dim-light melatonin onset (DLMO). Being exposed to bright lights in the evening or too little light during the day can disrupt the body normal melatonin cycles. For example, jet lag, shift work, and poor vision can disrupt melatonin cycles. Most functions of melatonin are produced through activation of melatonin receptors, while other functions are carried out due to its pervasive and powerful antioxidant, with a particular role in protection of nuclear and mitochondrial DNA. It acts as a direct scavenger of OH[•], O₂^{•-}, and NO. Oxidative stress plays a pivotal role in the development of diabetes complications, both microvascular and cardiovascular. The increase in glycoxidation and lipoxidation products in plasma and tissue proteins suggests that oxidative stress is increased in diabetes.

The aim was to determine the influence of melatonin on basal levels of glucose, reduced glutathione (GSH), activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), glutathione peroxidase (GPx) in the liver of alloxan diabetic rats.

Material and methods. The experiments were carried out on sexually mature male albino, not thoroughbred rats with the body mass – 0,18 – 0,20 kg. The animals were kept in a vivarium under the conditions of natural lighting at a constant temperature, air humidity and free access to water and food. Alloxan diabetes was evoked via injecting the rats with a 5% solution of alloxan monohydrate intraperitoneally in a dose of 170 mg/kg following a 24 hour period of fasting. The melatonin preparation was used in the research (the manufacturer – “Sigma”, USA). The animals were divided into 4 subgroups: 1) intact rats - artificial equinox (Light : Darkness = 12:12); 2) the control group (constant darkness) (L:D = 0:24); 3) alloxan diabetic rats (L:D = 0:24); 4) alloxan diabetic animals which were introduced the melatonin preparation intraperitoneally in a dose of 10 mg/kg at 8 a. m. daily during 7 days starting with a 5-th 24 hour period after the injection of alloxan (L:D = 0:24). Blood was taken from the tail vein evaluate the basal glycemia (BG) level with the use of One Touch Ultra (LifeScan, USA). On the third (critical) day the death of a part (50%) of the alloxan diabetic animals was observed. Rats were sacrificed at the twelfth day of the experiment accordance with the ethical treatment of animals.

Results. The introduction of melatonin during 7 days was conducive to a normalization of the level of BG in the group of animals with overt diabetes and a decrease of the BG level in the animals with occult diabetes, indicating a hypoglycemic action of the melatonin preparation. In rats that were under conditions of darkness content of G-SH, the activity of G6PD and GPx were respectively 31%, 44% and 27% higher compared with the control. A reliable decrease of the content of G-SH by 25% occurred in the liver of the rats with overt DM, whereas a reliable increase of this particular index by 37% was observed in the animals with occult DM in comparison with the indices of intact animals and that conforms to bibliographical findings. Activity of G6PD and GPx in the liver of rats with overt diabetes was on 25% and 20% respectively lower than in intact rats. Increased content of GSH in rats with latent diabetes is probably induced by enhanced regeneration of the oxidized form. In the blood of rats of this group activity of G6PD, GPx was on 110% and 20% respectively higher than in intact ones. The administration of the melatonin preparation induced a normalization of the index in question in the alloxan diabetic animals of both groups.

Conclusion. Thus, the introduction of melatonin during 7 days under condition of constant darkness to alloxan diabetic rats is conducive to a decrease in them of the level of BG as well as – a stabilization of the indices of the body's antioxidant defense disturbed under the conditions of an absolute deficit of insulin.