

УДК: 616.441-008.61:616.45-008.9]-092.9

С.О. Луцук, А.М. Яценко

Національний медичний університет імені Данила Галицького, м. Львів

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИЙ ГІПОТИРОЇДИЗМ ОБУМОВЛЮЄ ПОСИЛЕНЕ ЕКСПОНУВАННЯ ВУГЛЕВОДНИХ ДЕТЕРМІНАНТ α L_{Fuc}, β DGal ТА DGalNAc У НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗАХ ЩУРІВ

З використанням восьми лектинів різної вуглеводної специфічності (LCA, LABA, SNA, RCA, WGA, PNA, SBA і HPA) досліджували вплив експериментального гіпотиреоїдизму на вуглеводні детермінанти надниркових залоз щурів. Гіпотиреоїдний стан моделювали шляхом додавання в добовий раціон тварин мерказолілу з розрахунку 5 міліграм/кг маси протягом 30 діб. Надниркові і щитоподібні залози фіксували в 4% нейтральному формаліні і заключали в парафін. Для ідентифікації вуглеводних детермінант глікополімерів були використані кон'югати лектинів з пероксидазою хрину, візуалізацію здійснювали в системі діамінобензидин-Н₂O₂. Встановили, що експериментальний гіпотиреоїдизм індукує підвищення експонування вуглеводних детермінант α L_{Fuc}, β DGal і DGalNAc (рецепторів лектинів LABA, PNA і SBA відповідно). Зокрема, в надниркових залозах тварин контрольної групи лектин LABA контурював люменальну поверхню судин мозкової речовини, проте, не зв'язувався з судинним ендотелієм кори надниркової залози; на тлі гіпотиреоїдизму експонування фукозильних детермінант істотно зростало, що проявлялося в контурюванні судинного ендотелію як мозкового, так і трьох зон кіркової речовини. У надниркових залозах щурів дослідженої групи помітно зростало зв'язування лектину PNA з клітинами клубочкової зони, а також кількість PNA - і SBA - реактивних утворень характерної павукоподібної форми (ймовірно, цитоплазматичній зернистості суміжних ендокриноцитів) у складі кіркової і мозкової речовини. Отримані дані свідчать про істотний вплив гіпотиреоїдизму на структуру глікополімерів надниркових залоз; лектин LABA може бути рекомендований як селективний гістохімічний маркер судинного ендотелію надниркової залози щура.

Ключові слова: надниркова залоза, щур, експериментальний гіпотиреоїдизм, лектини.

Робота є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри гістології та ембріології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького «Пошук нових препаратів лектинів із сировини Карпатського регіону та можливості їх застосування у біології і медицині» (номер державної реєстрації 0107U001048).

Порушення функції щитоподібної залози належать до найпоширеніших захворювань, охоплюючи близько 3% населення світу [1, 5]. В Україні упродовж 1986-2006 років, головним чином у зв'язку з аварією на Чорнобильській АЕС, частота тиреоїдної патології зростає трикратно, а захворюваність на папілярний рак щитоподібної залози осіб підліткового віку з радіаційно забруднених регіонів підвищилася у 15 разів [2, 5]. Групу підвищеного ризику у цьому контексті становить також населення Карпатського регіону, що проживає в зоні ендемічного йодного дефіциту [4, 5].

Гіпотиреоїдизм пов'язаний з порушеннями основного обміну та інших обмінних процесів. Дефіцит тиреоїдних гормонів веде до сповільненого синтезу і розпаду білків, порушень еритропоезу, водно-електролітного балансу, обміну глікозаміногліканів, накопичення в тканинах глікопротеїнів муцинового типу, гіалуринової, хондроїтин-сірчаної кислот, які мають гідратаційні властивості і викликають своєрідний слизовий набряк тканин і органів, а також асцит, гідроперикард, гідроторакс [1, 5, 6]. При цьому, якщо поширеність маніфестного гіпотиреоїдизму коливається в межах 2-4%, то його субклінічними формами, при яких має місце підвищення рівня тиротропного гормону на тлі нормальних показників Т3 та Т4, за даними різних авторів, може бути охоплено до 6-12% популяції, з істотним переважанням уражень жінок та людей літнього віку [1, 5, 7]. Як значним поширенням, так і тим фактом, що навіть мінімальне зниження тиреоїдної функції супроводжується вираженими порушеннями діяльності серцево-судинної, травної, репродуктивної та інших систем організму, обумовлене щораз більше зацікавлення фахівців проблемами гіпотиреоїдизму.

Щитоподібна залоза функціонує у тісному взаємозв'язку з іншими залозами внутрішньої секреції, у тому числі з наднирниками. Незважаючи на давно відомі феномени поєднання гіпотиреоїдизму з гіпокортицизмом (синдром Шмідта), а також з пригніченням продукції катехоламінів [6, 7], багато тонких механізмів взаємозв'язку означених органів залишається нез'ясованими. Зокрема, у доступній літературі нам не вдалося відшукати даних щодо впливу гіпотиреоїдизму на глікополімери надниркових залоз. Поряд із цим відомо, що гліком клітини, модулюючи значну кількість фізіологічних реакцій, одним із перших специфічно реагує на появу і розвиток патологічного процесу [10, 12]. В арсеналі інструментів дослідження вуглеводних детермінант біологічних об'єктів в нормі і патології вагоме місце належать методам лектинової гістохімії [9, 10, 11, 12].

Метою роботи було з використанням лектинів різної вуглеводної специфічності дослідити якісні зміни вуглеводних детермінант структурних компонентів наднирників щура на тлі експериментального гіпотиреоїдизму.

Матеріал та методи дослідження. Досліди проводили на 20 (10 контроль, 10 дослід) статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар масою 150-180 г, які утримувались у стандартних умовах віварію з дотриманням норм біоетики щодо поводження з лабораторними тваринами. Гіпотиреоїдний стан моделювали шляхом додавання у добовий раціон тварин тиростатичного препарату мерказолілу (1-метил-2-меркапто-імідазол) (Здоров'я, Харків) з розрахунку 5 мг/кг маси протягом 30 днів. Щурі контрольної групи утримувались на

стандартній дієті віварію. Тварин виводили з експерименту шляхом передозування наркотизації діетиловим ефіром. Свідченням ефективності моделювання гіпотиреоїдизму служила так звана «струмогенна реакція» тварин, що отримували мерказоліл: макроскопічно їхні щитоподібні залози були у 2-3 рази більших розмірів у порівнянні з контролем; мікроскопічно у щурів дослідної групи тироїдні фолікули набували неправильної складчастої форми, містили меншу кількість колоїду або ж він був цілковито відсутній; тироїдний епітелій, кубічний у контролі, набував циліндричної форми, виявлялася гіперплазія тироцитів (рис.1).

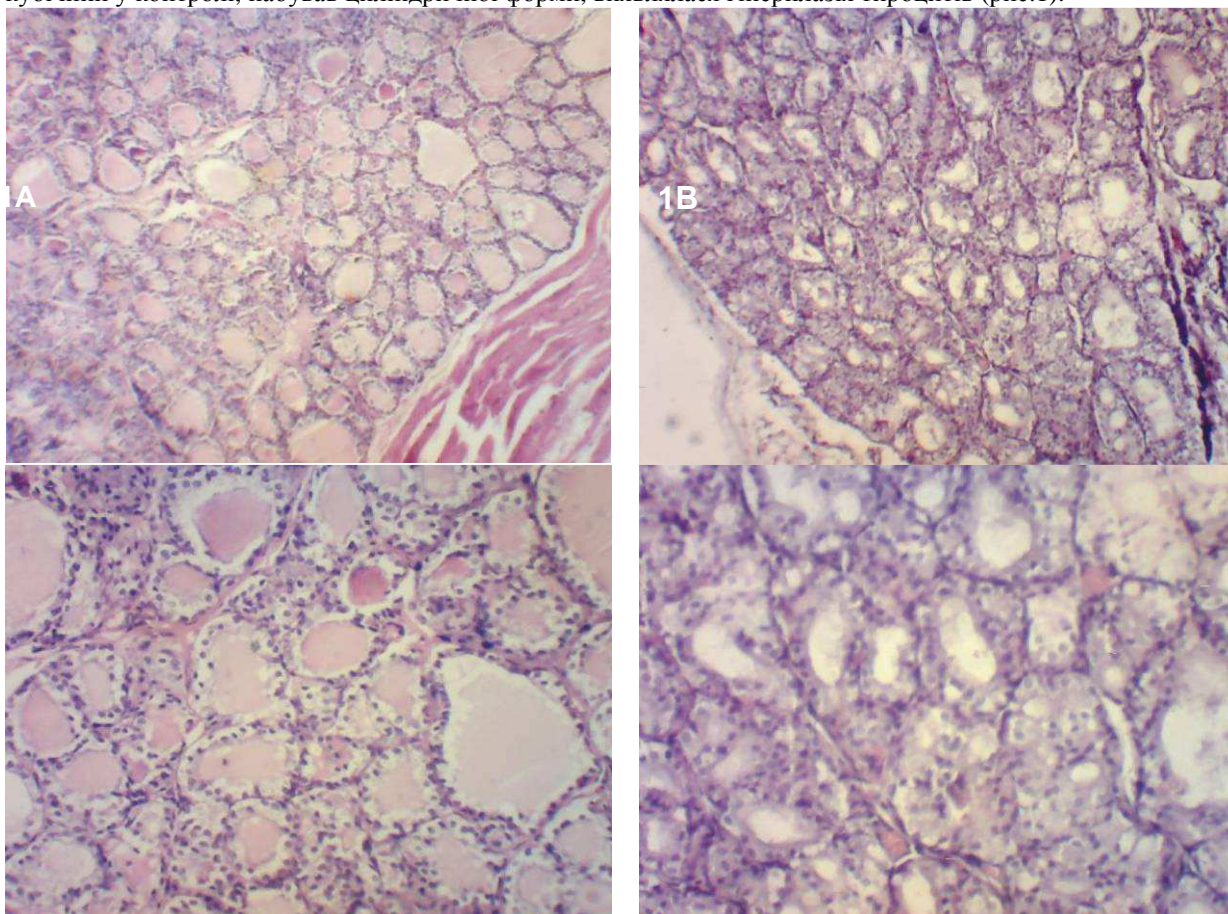


Рис.1. Щитоподібна залоза щурів контрольної групи (А,Б), та після згодовування мерказолілу (В,Г). Зафарбування гематоксиліном- еозином 3б. x 60 (А,В) ; x 150 (Б,Г).

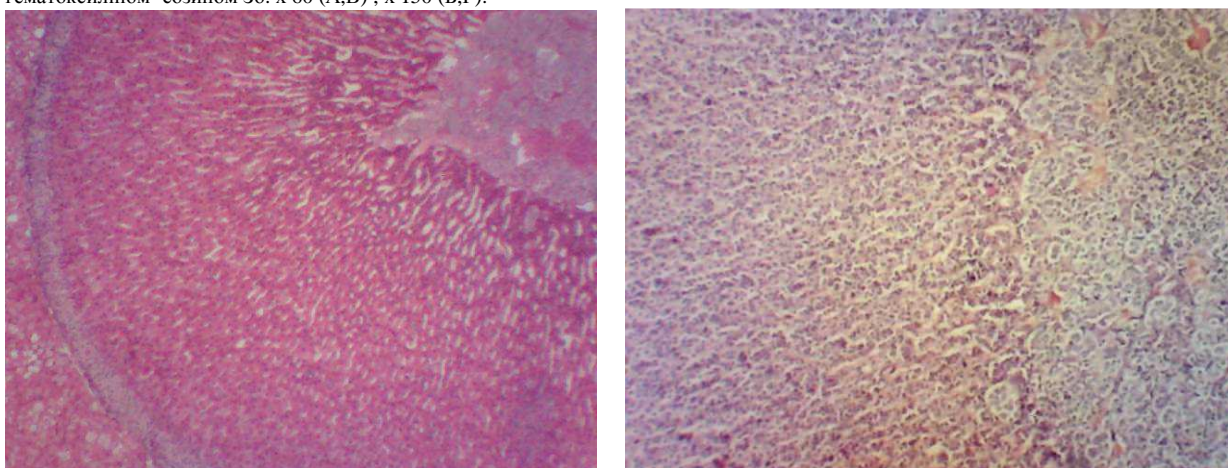


Рис.2. Надниркові залози контрольних А,Б, та гіпотиреоїдних (В,Г) щурів. Зафарбування гематоксиліном –еозином. 3б. x 60 (А,В) ; x 150 (Б,Г).

Щитоподібну та надниркові залози для гістологічного дослідження фіксували у 4% нейтральному формаліні і заливали у парафін. Загальну морфологію вивчали на препаратах, зафарбованих гематоксиліном і еозином. Для дослідження вуглеводних детермінант глікополімерів був використаний набір лектинів різної вуглеводної специфічності (табл.1), мічених пероксидазою хрому. Всі використані лектини були очищені та кон'юговані з пероксидазою доктором фармацевтичних наук В.О.Антоном.

Рецептори лектинів виявляли згідно з наступним протоколом [3]: (i) депарафіновані зрізи для пригнічення активності ендогенної пероксидази 30 хвилин інкубували в метанолі з 0,3% H_2O_2 ; (ii) через

батарею низхідних концентрацій етанолу (96-70-30%) доводили до забуференого ізотонічного розчину (PBS) рН 7,4; (iii) інкубували у трьох порціях PBS по 5 хвилин; (iv) на зрізи наносили розчин лектин-пероксидазних кон'югатів у PBS та інкубували 60 хвилин у вологій камері при кімнатній температурі (для кожного лектину ступінь розведення підбиралася індивідуально, пересічно в межах 10-25 мкг/мл); (v) візуалізацію рецепторів здійснювали 0,05% діамінобензидином тетрагідрохлоридом (Sigma, MO, USA) у присутності 0,015% H₂O₂ у PBS упродовж 10-20 секунд під контролем мікроскопа. Зафарбовані препарати двічі промивали у дистильованій воді і після дегідратації заключали у канадський бальзам.

Таблиця 1

Використані лектини та їх вуглеводна специфічність*

Назва лектину, його абревіатура	Специфічний моносахарид	Комплементарний олігосахаридний залишок
Лектин сочевиці, LCA	α DMan/ α DGlc	
Лектин кори золотого дощу, LABA	LFuc	Gal(β 1-4)Fuc(β 1-3)Glc
Лектин бузини чорної, SNA	NeuNAc(α 2-6)DGal	NeuNAc(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)
Лектин рицини, RCA	β DGal>NeuNAc	NeuNAc(2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc
Лектин зародків пшениці, WGA	DGlcNAc>NeuNAc	NeuNAc(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc, Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc
Лектин арахісу, PNA	DGal	DGal(β 1-3)GalNAc
Лектин сої, SBA	α DGalNAc> β DGalNAc	GalNAc(α 1-3)Gal(β 1-3)GalNAc
Лектин виноградного слимака, HPA	α DGalNAc	GalNAc(α 1-3)GalNAc

* Детальніше вуглеводна специфічність лектинів схарактеризована у монографіях [3, 9].

Для контролю специфічності гістохімічних реакцій було використано: (1) виключення лектин-пероксидазних кон'югатів з протоколу зафарбовування; (2) перед нанесенням розчину лектину, з метою окиснення вуглеводних детермінант глікополімерів, пре-інкубацію гістологічних зрізів 60 хвилин в 1% HIO₄ (Reanal, Budapest, Hungary); (3) додавання в інкубаційний розчин з лектином 0,5 М комплементарного моносахариду (табл.1). У першому випадку результати гістохімічної реакції були цілковито негативними; у другому – істотно редуковані; у третьому випадку спостерігалось зниження, але не цілковите пригнічення зв'язування лектинів LABA, WGA, PNA та SBA, що обумовлено вищою (до 1 000 000 разів) афінністю означених лектинів до тканинних глікокон'югатів у порівнянні з модельними моно- чи дисахаридами [10]. Окрім вищезазначеного, в якості своєрідного контролю специфічності реакції служило негативне забарвлення окремих клітинних компартментів на тлі лектино-реактивних структур.

Результати дослідження та їх обговорення. При дослідженні препаратів, зафарбованих гематоксиліном і еозином встановили, що як у контролі, так і при гіпотироїдизмі клітини клубочкової зони характеризувалися базофілією, яка поступово редукувалась у пучковій і сітчастій зонах; клітини мозкової речовини виявляли оксифільні властивості (рис.2А, Б). Специфічними рисами наднирників гіпотироїдних тварин було розширення просвіту судин мікроциркуляторного русла, нагромадження адипоцитів у паренхімі органа (рис.2В, Г); значна частина клітин при цьому виявляла ознаки каріопікнозу та підвищеної везикулярності цитоплазми.

Лектин LABA в нормі контуровав люменальну поверхню судин мозкової речовини, але не взаємодіяв з судинним ендотелієм кори наднирника (рис.3А, Б). На тлі гіпотироїдизму експонування фукозильних детермінант виразно зростало, що проявлялося у посиленні реактивності з лектином LABA судин мозкової речовини, а також контурованні судин усіх трьох зон кіркової речовини (рис.3В, Г). Зміни рецепторів лектинів WGA та SNA на тлі гіпотироїдизму були менш вираженими порівнянні з перерозподілом фукозогліканів і полягали у незначному посиленні зв'язування лектину WGA у поєднанні з редукцією рецепторів SNA. Як у нормі, так і на тлі гіпотироїдизму було задокументовано існування певних відмінностей у зв'язуванні використаних лектинів з судинним ендотелієм клубочкової, пучкової та сітчастої зон, а також мозкової речовини наднирників; лектин SNA демонстрував виражену афінність до ядерних глікокон'югатів ендокриноцитів.

Лектини арахісу, сої та виноградного слимака (PNA, SBA та HPA) у тварин контрольної групи виявляли високу спорідненість до волокнистих структур капсули і стінки субкапсулярних судин наднирників, а також зв'язувалися з цитоплазматичною зернистістю окремих клітин, локалізованих біля гемокапілярів пучкової зони (рис.4А, Б). У гіпотироїдних тварин експонування вуглеводних детермінант β DGal та DGlcNAc (рецепторів лектинів PNA, SBA та HPA) зростало; при цьому особливо помітним було підвищення PNA-реактивності клітин клубочкової зони (рис.4В, Г). Характерною морфологічною ознакою наднирників обох досліджуваних груп тварин було виявлення з використанням лектинів арахісу та сої специфічних павукоподібних утворень (рис.4А, Б), правдоподібно, ініційованих залишковою цитоплазматичною зернистістю суміжних ендокриноцитів. Таким чином, з восьми використаних лектинів, помітні зміни виявлені лише для рецепторів LABA, PNA та SBA, що може свідчити про гіпотироїдизм-індуковане накопичення фукозогліканів, а також вуглеводних детермінант β DGal та DGlcNAc в клітинах кіркової і, в меншій мірі, мозкової речовини наднирників. Правдоподібно, виявлений нами перерозподіл вуглеводних детермінант клітин кори наднирників служить віддзеркаленням одного із патомеханізмів розвитку кортикальної недостатності на тлі гіпотироїдизму [6].

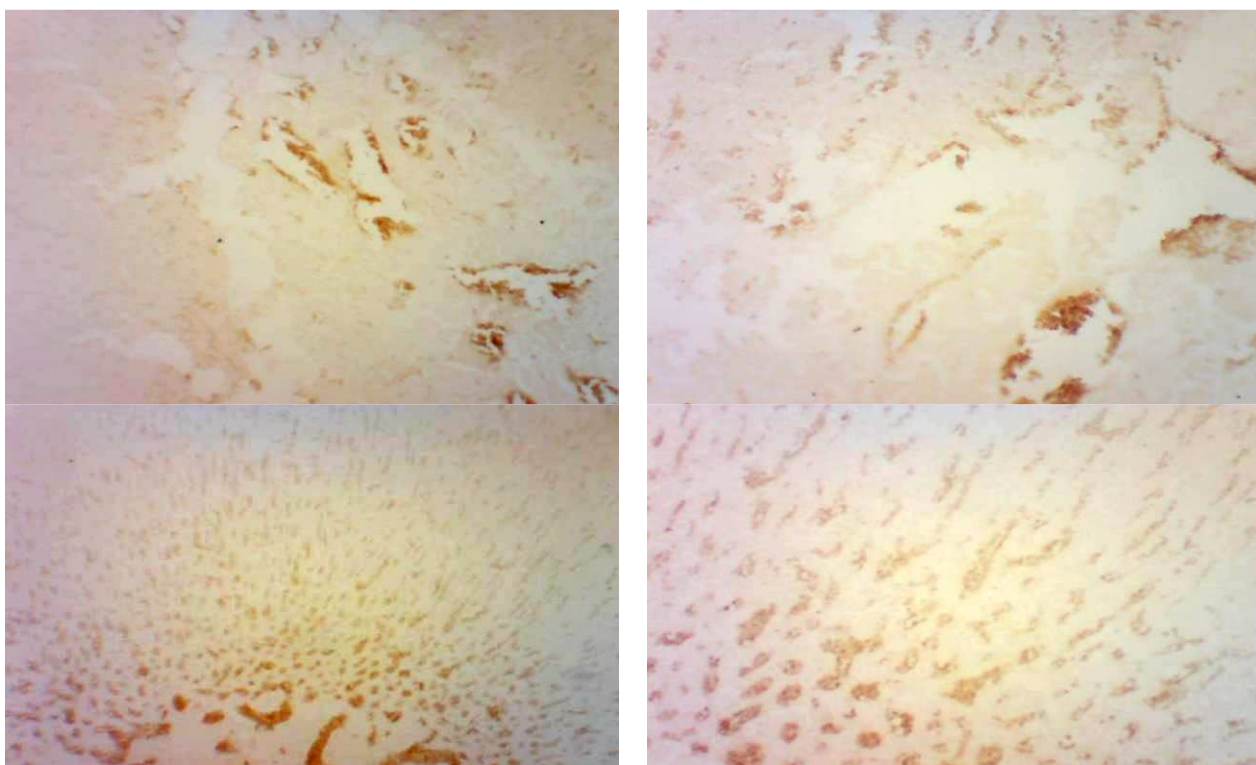


Рис.3. Зв'язування лектину LBA зі структурами наднирників контрольних (А,Б), та гіпотиреоїдних (В,Г) щурів. Зб. x 60 (А,В) ; x 150 (Б,Г).

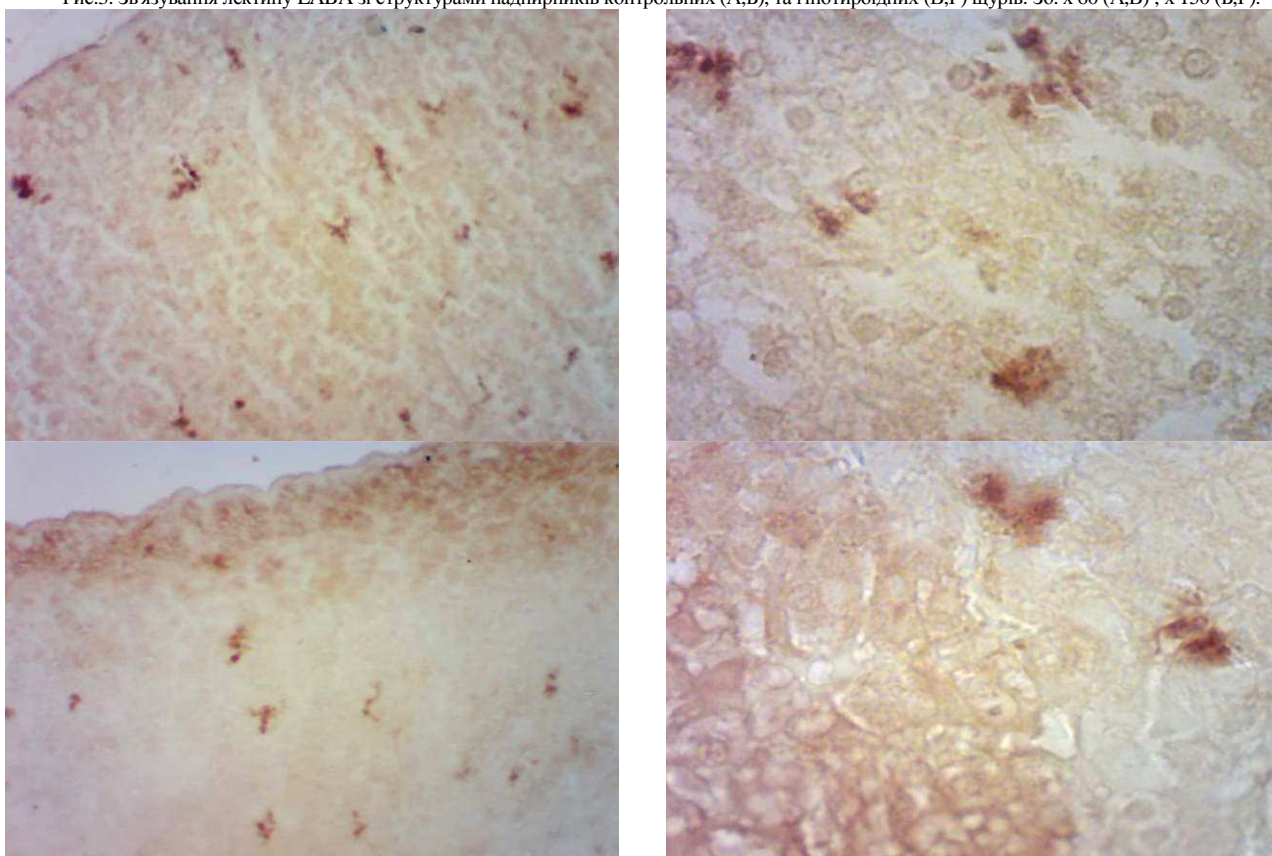


Рис.4. Зв'язування лектину PNA зі структурами наднирників контрольних (А,Б), та гіпотиреоїдних (В,Г) щурів Зб. x 150 (А,В) ; x 600 (Б,Г).

Ймовірними є два патогенетичних механізми вищезначеного ремоделювання глікополімерів: (1) демаскування субтермінальних залишків α LFuc, β DGal та DGalNAc в результаті незавершеності процесів кінцевого їх глікозилювання; (2) пригнічення секреторних процесів у ендокриноцитах наднирників з відповідним накопиченням рецепторів лектинів PNA та SBA. Щодо рецепторів останнього, то нам не вдалося виявити їх вибіркового експонування в складі цитоплазматичних глікокон'югатів клітин мозкової речовини наднирника, що було продемонстровано у праці Ahi et al.[8]. Можливо, це пов'язано з різними умовами фіксації, використаних вищезазваними авторами та у наших дослідженнях, а також відмінністю у вікових групах тварин.

Висновки

1. Гіпотиреоїдний стан організму має істотний вплив на структуру глікополімерів надниркових залоз, що проявляється у посиленні експонування вуглеводних детермінант α LFuc, β DGal та DGalNAc.
2. Зміни реактивності з лектинами клітин кіркової речовини наднирника, особливо у складі його клубочкової зони, були більш вираженими у порівнянні зі змінами мозкової речовини.
2. Найвищу чутливість до гіпотиреоїдизму виявляв ендотелій судинного русла наднирника, в якості селективного гістохімічного маркера якого може бути рекомендований лектин LABA.

Перспективи подальших досліджень: вивчити закономірності перебудови глікополімерів наднирників у процесі постнатального онтогенезу у порівнянні з гіпотиреоїдизмом, а також при корекції останнього L-тироксином.

ПОДЯКА: Автори висловлюють подяку докт.фарм.наук В.О.Антонюку за надані лектин-пероксидазні кон'югати, а також лаборантам Х.Струс, Р.Родик, Я.Федевич за технічну допомогу при виконанні цього дослідження.

Література

1. Браверман Л.І. Болезни щитовидной железы/ Л.Браверман, ред./ Москва: Медицина, 2000.-418 с.
2. Комиссаренко И.В. Хирургическое лечение рака щитовидной железы: 20 лет после аварии на Чернобыльской АЭС/ И.В.Комиссаренко, С.И.Рыбаков, А.Е.Коваленко// Эндокринология.-2006.-Т.11, №1.-С.119-121.
3. Луцки А.Д. Лектины в гистохимии/ А.Д.Луцки, Е.С.Детюк, М.Д.Луцки// Львов: Вища школа, 1989.-144 с.
4. Паньків В.І. Поширеність патології щитоподібної залози в йододефіцитних районах західної України/ В.І.Паньків// Ендокринологія.-2006.-Т.11, №1.-С.134-137.
5. Паньків В.І. Практична тиреоїдологія/ В.І.Паньків// Донецьк: В-во Заславського, 2011.-224 с.
6. Приступок О.М. Гіпотиреоз: ушкодження органів і систем/ О.М.Приступок// Міжнародний ендокринологічний журнал.-2011.-№ 4.-С.104-109.
7. Стеченко Л.А. Сердце при гипотиреозе/ Л.А.Стеченко, В.А.Петренко, Т.П.Куфтырева, А.П.Мотуляк, Л.И.Антоненко, Л.Л.Аршинникова// Ивано-Франковск: Симфония форте, 2008.-196 с.
8. Ahi M. The role of GalNAc terminal sugar on adrenal gland development/ M.Ahi, F.Zamansoltani, M.M.H.Taheri, A.R.E.Bideskan// Advan.Biol.Res.-2007.-V.1, № 1-2.-P.34-39.
9. Brooks S.A. Lectin histochemistry: a concise practical handbook/ S.A.Brooks, A.J.C.Leatham, U.Shumacher//Oxford: BIOS, 1997.
10. Gabius H.J. The sugar code: fundamentals of glycosciences/ H.J.Gabius// Weinheim: John Wiley & Sons, 2009.
11. Sharon N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules/ N.Sharon// J.Biol.Chem.-2007.-V.282.-P.2753-2764.
12. Varki A. Essentials of glycobiology, 2nd ed./ A.Varki, R.D.Cummings, J.D.Esko, M.E.Etzler eds. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.

Реферати

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ГИПОТИРОИДИЗМ ОБУСЛАВЛИВАЕТ УВЕЛИЧЕНИЕ ЭКСПОНИРОВАНИЯ УГЛЕВОДНЫХ ДЕТЕРМИНАНТ α LFuc, β DGal и DGalNAc В НАДПОЧЕЧНЫХ ЖЕЛЕЗАХ КРЫС

Луцки С.А., Ященко А.М.

С использованием восьми лектинов различной углеводной специфичности (LCA, LABA, SNA, RCA, WGA, PNA, SBA и HPA) исследовали влияние экспериментального гипотиреоидизма на углеводные детерминанты надпочечных желез крыс. Гипотиреоидное состояние моделировали путем добавления в суточный рацион животных мерказолила из расчета 5 мг/кг массы в течение 30 суток. Для идентификации углеводных детерминант глікополімеров были использованы конъюгаты лектинов с пероксидазой хрена, визуализацию осуществляли в системе диаминобензидин- H_2O_2 . Установили, что экспериментальный гипотиреоидизм индуцирует повышение экспонирования углеводных детерминант α LFuc, β DGal и DGalNAc (рецепторов лектинов LABA, PNA и SBA соответственно). В частности, в надпочечниках животных контрольной группы лектин LABA контурировал люменальную поверхность сосудов мозгового вещества, однако не связывался с сосудистым эндотелием коры надпочечника; на фоне гипотиреоидизма экспонирование фукозильных детерминант существенно возрастало, что проявлялось в контурировании сосудистого эндотелия как мозгового, так и трех зон коркового вещества. В надпочечных железах крыс опытной группы заметно возрастало связывание лектина PNA с клетками клубочковой зоны, а также количество PNA- и SBA-реактивных образований характерной паукообразной формы (вероятно, цитоплазматической зернистости смежных эндокриноцитов) в составе коркового и мозгового вещества. Полученные данные свидетельствуют о существенном влиянии гипотиреоидизма на структуру глікополімеров надпочечных желез; лектин

EXPERIMENTAL HYPOTHYROIDISM INDUCE INCREASED EXPOSURE OF α LFuc, β DGal AND DGalNAc CARBOHYDRATE DETERMINANTS IN RAT ADRENAL GLANDS

Lutsyk S.A., Yashchenko A.M.

A set of eight lectins with different carbohydrate affinities (LCA, LABA, SNA, RCA, WGA, PNA, SBA, and HPA) was used for the investigation of rat adrenal gland glycoconjugate remodeling under the influence of experimental hypothyroidism, induced with 5 mg/kg of antithyroid drug mercazolil, added daily to rat food allowance during 30 days. Carbohydrate determinants, labelled with lectin-peroxidase conjugates, were visualized with diaminobenzidine. Hypothyroidism induced enhancement of α LFuc, β DGal, and DGalNAc determinants exposure as detected by increased LABA, PNA, and SBA binding. Particularly, in control rats LABA reactivity was restricted to vascular endothelium of adrenal medulla, while under experimental conditions this same lectin strongly labelled also vascular endothelium of adrenal cortex. Under hypothyroidism PNA reactivity of zona glomerulosa cells increased significantly. PNA and SBA visualized characteristic spider-like structures of adrenal cortex and medulla, apparently representing secretory granules, retained by plasma membranes of adjacent hormone-producing cells. These data encompass significant influence of hypothyroidism on glycoconjugate processing in adrenal gland; lectin

LABA может быть рекомендован в качестве селективного гистохимического маркера сосудистого эндотелия надпочечника крысы.

Ключевые слова: надпочечная железа, крыса, экспериментальный гипотирозидизм, лектины.

Стаття надійшла 11.04.2012 р.

LABA can be recommended as selective histochemical marker of the rat adrenal gland vascular endothelium.

Key words: adrenal gland, rat, experimental hypothyroidism, lectins.

УДК 577.1

І.Ф. Мешинен, І.М. Яремій, О.Ю. Кушнір
Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ НА ГЛІКОЗИЛЮВАННЯ ГЕМОГЛОБІНУ В КРОВІ ТА ФУНКЦІОНУВАННЯ ГЛУТАТІОНОВОЇ СИСТЕМИ В ПЕЧІНЦІ АЛОКСАНДІАБЕТИЧНИХ ЩУРІВ

В статті показано, що у алоксандіабетичних щурів з явним та латентним діабетом порівняно з контролем відбувалися зміни рівня базальної глікемії, глікозилюваного гемоглобіну (HbA_{1c}) - в крові; відновленого глутатіону (G-SH), активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази - в печінці. Уведення алоксандіабетичним щурам мелатоніну в дозі 10 мг/кг маси впродовж 6-ти тижнів сприяло нормалізації вищезазначених показників.

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

Алоксан впливає на експресію генів, викликає апоптоз, а також пригнічення глюкозостимульованої секреції інсуліну [3]. Він реагує із сульфгідрильними групами, тому порушує синтез інсуліну. За рахунок зв'язування SH-груп інактивуються тіолові ферменти, які беруть участь у синтезі інсуліну. Розвиток алоксанового діабету в тварин відбувається за участю активних форм кисню [5]. У присутності внутрішньоклітинних тіолів, особливо глутатіону, алоксан генерує активні радикали кисню в циклі редокс-реакцій [2].

Мелатонін, як відомо [7], є одним із ендогенних антиоксидантів. Припускають [8], що дефіцит цього гормону може спричинити порушення толерантності до глюкози.

Метою роботи було з'ясувати вплив мелатоніну на рівень базальної глікемії (БГ), глікозилюваного гемоглобіну (HbA_{1c}) у крові, відновленого глутатіону (G-SH), глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-ФДГ), глутатіонредуктази (ГР), глутатіонпероксидази (ГП) в печінці щурів.

Матеріал та методи дослідження. Експерименти проведені в лютому-березні на 70 статевозрілих самцях безпородних білих щурів масою 0,18 - 0,20 кг. Алоксановий діабет, викликали шляхом уведення щурам 5%-го розчину алоксану моногідрату внутрішньоочеревинно в дозі 170 мг/кг одноразово, після 24-годинного голодування. 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 $\approx 50\%$ алоксандіабетичних щурів. Дослідних тварин було розділено на шість груп: 1) контрольна група; 2) щури з явним ЦД; 3) щури з явним ЦД, які починаючи з 5-ої доби після введення алоксану отримували ін'єкції інсуліну (Фармасулін Н НР, виробник ВАР "Фармак", Україна) з розрахунку, що 1 ОД інсуліну утилізує 2 ммоль/л глюкози; 4) щури з явним ЦД, яким починаючи з 5-ої доби після введення алоксану впродовж 6-ти тижнів щоденно о 8 годині ранку внутрішньоочеревинно вводили мелатонін (виробник "Sigma", США) в дозі 10 мг/кг маси; 5) щури з латентним ЦД; 6) щури з латентним ЦД, яким аналогічно впродовж 6-ти тижнів вводили мелатонін. Дослідних тварин забивали шляхом декапітації на 47-му добу від початку експерименту у відповідності до етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 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 [1].

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 вистовують 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 дослідження та їх обговорення. Згідно отриманих результатів (табл. 1), у частини щурів уведення алоксану моногідрату викликало різке зростання рівня БГ натще (на 111% порівняно з показниками контрольної групи тварин); такі тварини сформували групу щурів із явним ЦД ($BG \geq 8,0$ ммоль/л). У решти алоксандіабетичних тварин рівень БГ не відрізнявся від показників інтактних щурів ($BG \leq 6,9$ ммоль/л); таких тварин було об'єднано в групу алоксандіабетичних щурів із латентним ЦД. Уведення мелатоніну впродовж 6-ти тижнів сприяло нормалізуванню рівня БГ в групі тварин із явним ЦД та зниженню рівня БГ (на 37%