

О. А. Темірова<sup>1</sup>, М. В. Хайтович<sup>1</sup>, А. П. Бурлака<sup>2</sup>, А. В. Вовк<sup>2</sup>

# Модифікуючий вплив N-ацетилцистеїну, мелатоніну та їхнього поєднання на стан електронно-транспортного ланцюга мітохондрій та антиоксидантної системи в головному мозку щурів за експериментального цукрового діабету 1 типу

<sup>1</sup>Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ<sup>2</sup>Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького Національної академії наук України, м. Київ

**Ключові слова:** цукровий діабет 1 типу, N-ацетилцистеїн, мелатонін, мітохондрії, супероксидний радикал, глутатіон, каталаза

Проблема цукрового діабету (ЦД) має велике медико-соціальне та загальнолюдське значення. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я в світі кількість пацієнтів з ЦД становить майже 190 млн. В Україні за поширеністю ЦД посідає третє місце після серцево-судинних та онкологічних захворювань. Так, станом на 1 січня 2017 року, у країні зареєстровано 1,24 млн осіб з ЦД [1].

Спостерігається тенденція до зростання захворюваності та поширеності ЦД 1 типу (ЦД1) у дитячому віці. У світі число дітей, хворих на ЦД1, становить 542 тис., а річний приріст уперше виявлених випадків – 86 тис. [2]. Збільшення поширеності ЦД серед дитячого населення характерне й для України. Повідомляється, що в 2017 році хворобу зареєстровано в 9538 дітей та підлітків віком від 0–18 років, з них уперше діабет діагностовано в 1368 осіб [3].

У більшості пацієнтів розвиваються характерні для ЦД ускладнення – полінейропатії, нефропатії, ретинопатії, ангіопатії та ін. Окремо виділяють діабетичну енцефалопатію (ДЕ), що виявляється майже в 80 % осіб з ЦД і суттєво погіршує якість їхнього життя [4].

Хоча в основі розвитку ДЕ за ЦД1 і ЦД2 лежить порушення вуглеводного обміну, але фактори розвитку та основні механізми дещо відрізняються. Так, для пацієнтів з ЦД2 є характерною «змішана енцефалопатія», основними факторами ризику якої є дисліпідемія та артеріальна гіпертензія, тоді як для пацієнтів з ЦД1 є характерною ДЕ в «чистому вигляді», головним чинником розвитку якої вважається оксидативний стрес (ОС) [5, 6]. Встановлено, що ОС, викликаний гіперглікемією, виявляється надмірним утворенням реактивних форм кисню та виснаженням системи антиоксидантного захисту, що призводить до енергетичного виснаження та, як наслідок, пошкодження та загибелі нейронів [7–9]. Зокрема, хронічна гіперглікемія призводить до активації поліолового шляху, що спричиняє виснаження запасів НАДФН, які необхідні для ферментативного відновлення глутатіону (ВГ). Зменшення рівня ВГ є однією з причин зменшення активності оксиду нітрогену (NO) за ЦД і його ускладнень [6].

Тому корекцію ОС вважають одним із найперспективніших напрямів церебропротекції за ЦД1.

Відомо, що N-ацетилцистеїн (НАцц) виявляє потужні антиоксидантні (АО) властивості, у тому числі в разі захворювання центральної нервової системи [10–12]. Протекторні властивості НАцц пов'язують зі здатністю збільшувати

рівень глутатіону, який захищає клітини від вільних радикалів [13]. Як антиоксидант НАцц розщеплює гідроксильний радикал пероксид гідрогену і хлористоводневу кислоту [14]. Результатами останніх досліджень показана здатність НАцц зменшувати експресію індукцибельної NO-синтази (iNOS) [15–18].

Також активно вивчається здатність мелатоніну (Мел) пригнічувати інтенсивність ліпопероксидації та підвищувати стійкість до ОС шляхом протекції мікосомальних мембран і збільшення активності ферментів АО захисту (каталази (КАТ), глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази) [19, 20]. Окрім того, Мел може послаблювати глутаматну нейротоксичність, агресивність NO, активувати фактори росту нейронів та одночасно обмежувати апоптоз нервових клітин [21].

*Мета дослідження* – вивчення впливу НАцц, Мел та їхнього поєднання на стан електронно-транспортного ланцюга (ЕТЛ) мітохондрій та АО системи в головному мозку щурів за експериментального ЦД1.

**Матеріали та методи.** Дослідження проводили на 130 статевозрілих щурах-самцях лінії Wistar масою 200–260 г. Тварин вирощували й утримували на звичайному збалансованому харчовому раціоні та вільному доступі до води в умовах віварію Національного медичного університету імені О. О. Богомольця. Усі маніпуляції були проведені відповідно до Закону України від 21 лютого 2006 року № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» [22] та згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей [23]. Дотримання біоетичних норм засвідчено експертним висновком Комісії з питань етики НМУ імені О. О. Богомольця (протоколи від 28 грудня 2016 р. № 99; від 22 лютого 2019 р. № 119).

ЦД1 моделювали в тварин шляхом введенням стрептозотоцину (STZ) (Sigma, США) у дозі 50 мг/кг у цитратному буферному розчині (рН 4,5) одно-

разово інтраперитонеально відповідно до методичних рекомендацій [24]. Для зниження симптомів гіпоглікемії та кетоацидозу, які виникають після ін'єкції, дослідні тварини протягом 48 год отримували 5 % розчин глюкози з поїлки. Через 72 год після ін'єкції STZ у дослідних щурів вимірювали рівень глюкози в крові з хвостової вени, використовуючи глюкометр One Touch Select Simple (LifeScan, США). В експеримент включали тварин, що мали стійку гіперглікемію з рівнем глюкози понад 15 ммоль/л. Протягом експерименту визначали рівень глюкози кожного тижня, масу тіла, оцінювали зовнішній вигляд тварин.

Тварини були розділені на підгрупи: 1) інтактний контроль (ІК); 2) контрольна патологія (КП, тварини з ЦД1, яким вводили фізіологічний розчин); 3) НАцц (тварини з ЦД 1, яким вводили НАцц (STADA) у дозі 1500 мг/кг); 4) Мел (щури з ЦД1, які отримували Мел (Київський вітамінний завод) у дозі 10 мг/кг); 5) НАцц + Мел (група модельних тварин з ЦД1, яким вводили комбінацію НАцц і Мел). Підбір дозування НАцц здійснювали на основі проведених раніше досліджень співробітниками кафедри клінічної фармакології та клінічної фармації Національного медичного університету імені О. О. Богомольця. Обрана доза 1500 мг/кг є найефективнішою щодо попередження індукованого гіперглікемією ОС та виявлення нейропротекторних властивостей, що співпадає з даними літератури [25–27]. Підбір дозування Мел здійснювали відповідно до аналізу джерел літератури [28–32]. Лікарські засоби вводили внутрішньошлунково протягом 5 тижнів, починаючи з 15 доби після відтворення контрольної патології.

Евтаназію здійснювали декапітацією під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг, внутрішньоочеревинно) з метою забору крові та головного мозку. З головного мозку видаляли кров, відділяли від мозкової оболонки, лобову ділянку головного мозку поміщали в рідкий азот для проведення електронної парамагнітно-резонансної (ЕПР) спектроскопії, решту мозку гомогенізували

для визначення вмісту ВГ та активності КАТ. З метою виділення мітохондріальної фракції лобову ділянку головного мозку подрібнювали в рідкому азоті та гомогенізували за температури 2 °С у середовищі сахарози, трис-НСІ-буферу та ЕДТА-1. Методом диференціального центрифугування виділяли мітохондріальну фракцію [33].

Стан мітохондріального ЕТЛ у клітинах головного мозку оцінювали методом ЕПР за амплітудою та положенням таких парамагнітних центрів з g-факторами: 1,94 – залізоісичаних протеїнів (ЗСП) у N2; 2,003 – радикалів убісеміхінону; 2,03 – негемових нітрозильних комплексів заліза, на комп'ютеризованому спектрометрі РЕ-1307 відповідно до методики [34].

Для вивчення впливу НАцц, Мел та їхнього поєднання на етапі ініціації ОС визначали швидкість генерування супероксидних радикалів (СР) і рівень NO у тканині головного мозку щурів. Супероксид-генеруючу активність визначали методом ЕПР з використанням спінового уловлювача 2,2,6,6,-тетраметил-4-оксипіперидину за кімнатної температури. Рівень NO досліджували методом ЕПР у низькотемпературному режимі з використанням діетилдитіокарбамату (Sigma, USA) як спінового уловлювача [34].

Вплив досліджуваних лікарських засобів на кінцевих етапах ОС оцінювали за рівнем ВГ та активністю КАТ. Вміст ВГ у гомогенаті тканини головного мозку визначали спектрофотометрично ( $\lambda$  412 нм) за реакцією взаємодії з 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою з утворенням тіонітрофенільного аніона, кількість якого пропорційна кількості тіолових груп, що прореагували з кислотою [35]. Попередньо проводили осадження білків 20 % розчином трихлороцтової кислоти (центрифугували 15 хв 3000 g). До супернатанту додавали фосфатний буфер (рН 7,4) і реактив Елмана. Потім визначали оптичну густину.

Визначення активності КАТ проводили за методом М. Корольок і співавт. [36], принцип якого полягає в тому, що КАТ руйнує перекис водню, незруйнована частина якого в разі взаємодії з

солями молібдату амонію утворює стійкий забарвлений комплекс, який визначали спектрофотометрично ( $\lambda$  410 нм).

З метою оцінки протекторних властивостей НАцц, Мел та їхнього поєднання також було вивчено вплив на рівень церулоплазміну (ЦП), трансферину (ТФ), метгемоглобіну (MetHb) у крові щурів з ЦД1. Для цього в пробірку з 1 мл трилону Б набирали 3 мл крові, потім заморожували в спеціальній прес-формі в рідкому нітрогені для дослідження методом ЕПР [37]. Реєстрацію рівнів ЦП, ТФ, MetHb проводили на спектрометрі РЕ-1307 за температури рідкого азоту 77 °К. Вміст ЦП оцінювали за амплітудою сигналу ЕПР з g-фактором 2,05, ТФ – 4,25 та MetHb – 6,3.

Статистичну обробку даних проводили методом варіаційної статистики за допомогою програм «IBM SPSS Statistics Base version 22.0» і «Medstat». Для з'ясування міжгрупових відмінностей у випадку нормального розподілу вибірових даних використовували t-критерій Стьюдента (для парних порівнянь) або однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA за критерієм Шеффе та Даннета. За відсутності нормального розподілу використовували U-критерій Манна-Уїтні. Відмінності вважали достовірними в разі  $P < 0,05$ . Точкову оцінку результатів представляли у вигляді середніх значень і стандартної похибки середнього ( $M \pm m$ ).

**Результати та їх обговорення.** Через 7 тижнів після моделювання ЦД1 у щурів групи КП встановлено зниження порівняно з інтактним контролем амплітуди сигналу ЕПР з g-фактором 1,94 ( $0,125 \pm 0,01$ ) проти ( $0,58 \pm 0,07$ ) відн. од.,  $p < 0,05$ ) і 2,003 ( $0,14 \pm 0,01$ ) проти ( $0,35 \pm 0,05$ ) відн. од.,  $p < 0,05$ ), тоді як амплітуда g-2,03 зростала ( $0,09 \pm 0,01$ ) проти ( $0,05 \pm 0,02$ ) відн. од.,  $p < 0,05$ ). Таким чином, у щурів з ЦД1 встановлено значне зменшення ЗСП (g-1,94) (ЗСП N-2), що є важливими компонентами в I пункті супряження окиснення та фосфорилування в дихальному ланцюзі, у разі пошкодження якого мітохондрії втрачають здатність синтезувати АТФ, а кисень відновлюється до СР. Разом з тим, зростання амплітуди

сигналу нітрозильних комплексів заліза (NO-FeS-білки, g-2,03) є маркером вільнорадикальних процесів та ушкодження мембранних структур. Зменшення рівня радикалів убісеміхінону (g-2,003) у клітинах головного мозку щурів з ЦД1 вказує на порушення функціонування CoQ в ЕТЛ мітохондрій, у результаті чого втрачається здатність до переносу електронів у I і III комплексах ЕТЛ, відбувається генерування реактивних форм кисню. Отримані дані можуть свідчити про ушкодження ЕТЛ мітохондрій головного мозку щурів з ЦД1.

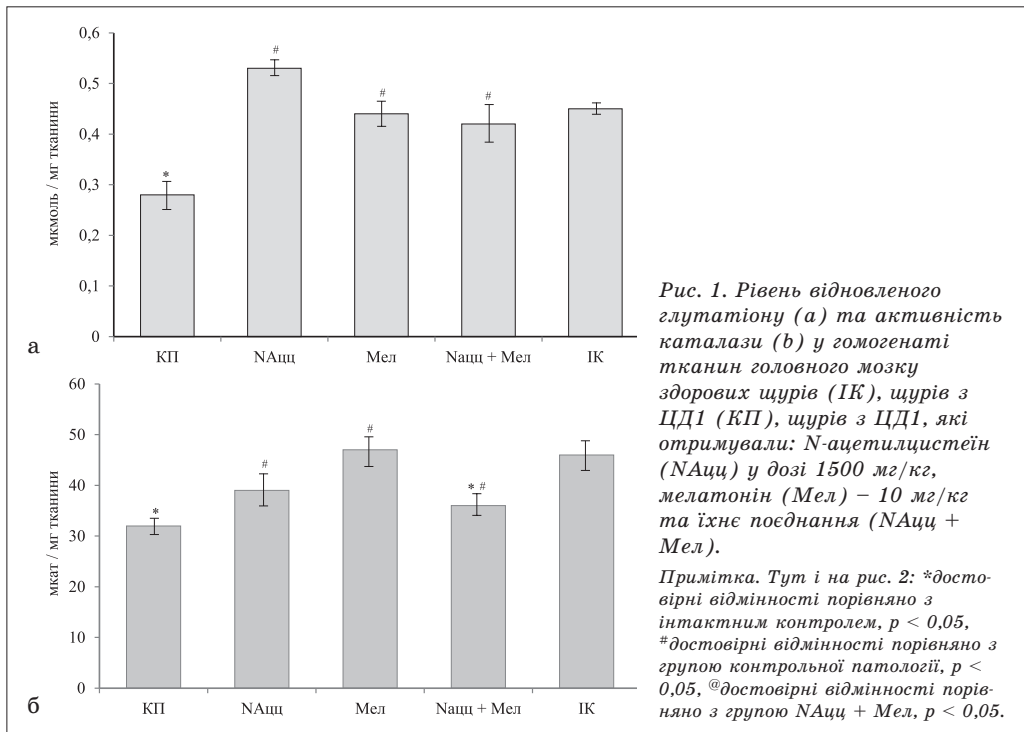
За умов застосування НАцц, Мел, а особливо їхнього поєднання відбулося зростання вмісту ЗСП N-2 ( $0,20 \pm 0,06$ ) відн. од., ( $0,22 \pm 0,01$ ) відн. од. та ( $0,25 \pm 0,01$ ) відн. од.,  $p < 0,05$ ) порівняно з групою КП, що може свідчити про їхню здатність попереджувати ушкодження даних компонентів ЕТЛ мітохондрій головного мозку щурів за умов експериментального ЦД1. Застосування лікарських засобів не мало суттєвого впливу на величину ЕПР NO-FeS-білки. Імовірно, вказані зміни в мембранах клітин головного мозку відбуваються на початкових етапах, і використання лікарських засобів через 2 тижні після індукції ЦД1 STZ не впливає на нормалізацію нітрозильних комплексів. Однак сумісне використання НАцц і Мел за умов експериментального ЦД1 супроводжувалося зростанням вмісту убісеміхінону в 2,0 разу ( $0,28 \pm 0,01$ )  $p < 0,05$ ), що може бути пов'язано зі здатністю регулювати біосинтез CoQ, мембраностабілізуючими та антиоксидантними властивостями.

Індукція ЦД1 супроводжувалася зростанням швидкості генерування СР у мітохондріях тканини головного мозку щурів ( $0,93 \pm 0,14$ ) нмоль/г тканини · хв проти ( $0,15 \pm 0,05$ ) нмоль/г тканини · хв,  $p < 0,05$ ), тоді як швидкість генерування NO зменшувалася ( $0,47 \pm 0,04$ ) нмоль/г тканини · хв проти ( $1,29 \pm 0,09$ ) нмоль/г тканини · хв,  $p < 0,05$ ), що вказує на зменшення biodоступності NO і збільшення ОС. Аналіз змін швидкості генерування СР через 5 тижнів фармакотерапії показав статистично достовірне зниження порівняно з групою КП ( $p < 0,05$ ).

Зокрема, найнижчі значення отримані за поєданого використання НАцц і Мел ( $0,55 \pm 0,08$ ) нмоль/г тканини · хв), тоді як монотерапія була менш ефективною ( $0,75 \pm 0,07$ ) нмоль/г тканини · хв та  $0,67 \pm 0,09$  нмоль/г тканини · хв). Введення НАцц, Мел та особливо їхнього поєднання сприяло порівняно з групою КП зростанню рівня NO ( $0,70 \pm 0,05$ ) нмоль/г тканини · хв, ( $0,87 \pm 0,10$ ) нмоль/г тканини · хв і ( $0,95 \pm 0,05$ ) нмоль/г тканини · хв  $p < 0,05$ ) у клітинах головного мозку щурів з ЦД1.

Моделювання стрептозотоцинового ЦД1 супроводжувалося виснаженням системи АО (рис. 1) захисту, про що свідчило зменшення рівня ВГ ( $0,30 \pm 0,02$ ) мкмоль/мг тканини проти ( $0,43 \pm 0,01$ ) мкмоль/мг тканини в групі ІК,  $p < 0,05$ ) та активності КАТ ( $30,87 \pm 1,51$ ) мкат/мг тканини проти ( $49,05 \pm 3,58$ ) мкат/мг тканини в групі ІК,  $p < 0,05$ ). Окрім того в тварин групи КП встановлено зменшення коефіцієнта NO/ВГ: ( $1,6 \pm 0,03$ ) проти ( $3,0 \pm 0,015$ ). Фармакотерапія НАцц, Мел і НАцц + Мел спричинила достовірне ( $p < 0,05$ ) підвищення рівня ВГ у головному мозку щурів зі стрептозотоциновим ЦД (рис. 1а). Найбільше значення відмічено в тварин, які отримували НАцц ( $0,53 \pm 0,01$ ) мкмоль/мг тканини, тоді як коефіцієнт NO/ВГ найближчим до значень ІК був у групі комбінації досліджуваних ЛЗ ( $2,3 \pm 0,04$ ). Рівень активності КАТ (рис. 1б) відновлювався в усіх групах фармакологічної корекції порівняно з КП ( $p < 0,05$ ). Найбільша активність ферменту відмічалась у групі тварин, які отримували Мел ( $48,84 \pm 3,20$ ) мкат/мг тканини).

За вивчення стану АО захисту в крові щурів зі стрептозотоциновим ЦД1 (рис. 2) відмічено збільшенням рівня ЦП у 1,3 разу та MetHb у 9,5 разу ( $p < 0,05$ ), тоді як рівень ТФ зменшився в 1,5 разу порівняно з ІК ( $p < 0,05$ ). Застосування НАцц, Мел та їхнього поєднання супроводжувалося змінами вмісту ТФ, ЦП і MetHb у крові щурів зі стрептозотоциновим ЦД1. Так, у групах тварин НАцц і Мел вміст ТФ зріс у 1,5 разу, а в разі сумісного застосування лікарських засобів у 2,0 разу

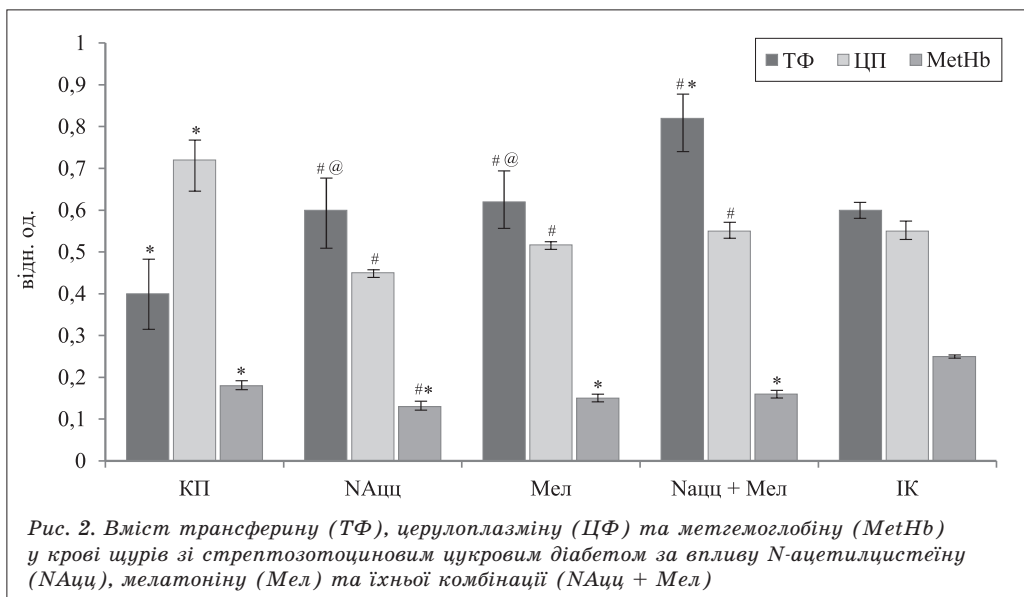


порівняно з КП ( $p < 0,05$ ). Під впливом NAцц вміст ЦП зменшився в 1,6 разу, Мел – у 1,4, а NAцц + Мел – у 1,3 разу ( $p < 0,05$ ). Рівень MetHb у групі NAцц зменшився в 1,6 разу, у групах Мел і NAцц + Мел – у 1,3 разу ( $p < 0,05$ ).

Отже, сумісне застосування NAцц і Мел протягом 5 тижнів сприяє нормалізації ЕТЛ мітохондрій і виявляє тим самим АО вплив на клітини головного мозку щурів з ЦД1. У разі монотерапії

NAцц і Мел виявляли протекторний вплив на кінцевих етапах ОС. Зокрема, Мел за експериментального ЦД1 сприяв підвищенню активності КАТ, тоді як NAцц–ВГ.

Результати останніх досліджень вказують, що саме мітохондріальна дисфункція є основою нейродегенеративних порушень у разі захворювань центральної нервової системи [38, 39]. В окремих дослідженнях показано, що



порушення функціонування ЕТЛ мітохондрій залучене до патогенезу ДЕ. Зокрема М. Chomova та співавтор. було показано зменшення активності комплексу I ЕТЛ мітохондрій головного мозку щурів з експериментальним ЦД1 [40]. В іншому дослідженні Y. Zhou та співавтор. довели, що моделювання стрептозотцинового ЦД1 супроводжується розвитком мітохондріальної дисфункції нейронів головного мозку, що призводить до розвитку когнітивного дефіциту [41]. Тому актуальним є подальше вивчення мітохондрій як мішеней для терапії, а також для розуміння патофізіології уражень головного мозку за ЦД1.

Результати окремих попередніх досліджень також вказують на мітопротекторні властивості НАцц. Зокрема, D. J. Wright та співавтор. було встановлено покращання функціонування мітохондрій, що супроводжувалося зменшенням когнітивного дефіциту за моделювання хвороби Гантингтона [42]. Т. Al-Nahdi та співавтор. у дослідгах *in vivo* доведено, що введення НАцц супроводжувалося відновленням мембранного балансу мітохондрій, окисно-відновного гомеостазу, запобігало апоптозу та сприяло нормалізації синтезу інсуліну  $\beta$ -клітинами підшлункової залози [43]. Іншими дослідниками *in vitro* встановлено, що введення Мел у концентрації 0,5, 1, 5, 10  $\mu\text{M}$  сприяло відновленню мембранного потенціалу мітохондрій і зменшенню ОС у шванівських клітинах на фоні гіперглікемії [44]. Експериментальні дослідження вказують на здатність НАцц знижувати експресію iNOS і відновлювати рівень NO у тканинах головного мозку за патологічних умов [45, 46]. Повідомляється, що Мел здатний нейтралізувати реактивні форми кисню

в ЦНС при експериментальних і клінічних дослідженнях у пацієнтів з епілепсією [47]. Таким чином, результати даних досліджень підтверджують важливість забезпечення саме мітопротекторного впливу для зменшення вираженості енцефалопатії за ЦД1.

## Висновки

1. За експериментального ЦД1 відбуваються порушення ЕТЛ мітохондрій і роз'єднання клітинного дихання з фосфорилюванням у нейронах головного мозку. Так, встановлено зменшення в 4,6 разу ( $p < 0,05$ ) ЗСП, у 2,5 разу – рівня радикалів убіхінону ( $p < 0,05$ ), підвищення в 1,2 разу рівня нітрозольних комплексів заліза ( $p < 0,05$ ).
2. Встановлено, що НАцц і Мел активують ендogenous систему АО захисту головного мозку щурів зі стрептозотциновим ЦД1. Зокрема, застосування НАцц супроводжувалося підвищенням у 1,8 разу ( $p < 0,05$ ) рівня ВГ, тоді як використання Мел – збільшенням у 1,6 разу активності КАТ ( $p < 0,05$ ). Окрім того, вказані лікарські засоби, особливо в разі їхнього поєданого застосування, нормалізували АО захист крові щурів з ЦД1, про що свідчило наближення рівня ТФ, ЦП і MetHb до значень інтактного контролю ( $p < 0,05$ ).
3. Застосування НАцц разом з Мел протягом 5 тижнів асоціювалось з високим антирадикальним ефектом у тканині головного мозку щурів з експериментальним ЦД1, знижуючи рівень генерування СР у 1,7 разу ( $p < 0,05$ ), попереджуючи зниження рівня ЗСП N2 і радикалів убіхінону в 2,0 разу порівняно з КП ( $p < 0,05$ ), сприяючи нормалізації ЕТЛ мітохондрій.

1. Українська база медико-статистичної інформації [Електронний ресурс]. URL: <http://medstat.gov.ua/ukr/normdoc/vooz.html>.
2. Майданник В. Г., Шевченко Т. А. Стан перекисного окислення ліпідів та антиоксидантної системи у дітей, хворих на цукровий діабет 1 типу, залежно від наявності хронічних ускладнень. *Проблеми клінічної педіатрії*. 2018. № 4 (42). С. 6-13.
3. Зелінська Н. Б., Руденко Н. Г., Крушинська З. Г. Хвороби ендокринної системи в дітей України у 2017 році: показник поширеності й захворюваності та їх динаміка. *Український журнал дитячої ендокринології*. 2018. № 2. С. 5–15.
4. Родинський О. Г., Басиста К. І., Гузь Л. В. Нейрохімічні та поведінкові процеси в геронтогенезі за умов експериментальної гіперглікемії. *Медичні перспективи*. 2018. Т. 18, № 2. С. 4–13.

5. Михайличенко Т. Е. Динамика функционального состояния головного мозга у больных сахарным диабетом при использовании комплексной терапии. *Медичний форум*. 2019. № 16. С. 61–63.
6. Ушакова Г. О. Молекулярні механізми розвитку енцефалопатії; за ред. проф. Г. О. Ушакової. Дніпро : ДНУ імені Олеса Гончара, 2017. 203 с.
7. Паньків В. І. Патогенетичне лікування діабетичної нейропатії: комплексний підхід. *International journal of endocrinology*. 2012. № 7 (47). С. 55–60.
8. Kushnir O. Yu., Yaremii I. M. Antioxidant action of melatonin in the brain of alloxan diabetic rats. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2017. Т. 6, № 2 (60). С. 37–40.
9. Physiological targets for the treatment of diabetic encephalopathy. L. L. Vieira et al. *Central nervous system agents in medical chemistry*. 2016. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27121380>.
10. N-Acetylcysteine in combination with IGF-1 enhances neuroprotection against proteasome dysfunction-induced neurotoxicity in SH-SY5Y Cells. B. Cheng et al. *Parkinson's disease*. 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6564212>.
11. N-Acetylcysteine in depressive symptoms and functionality: a systematic review and meta-analysis. B. Fernandes et al. *The Journal of Clinical Psychiatry*. 2016. <https://doi.org/10.4088/JCP.15r09984>.
12. N-acetylcysteine in the treatment of psychiatric disorders: current status and future prospects. A. Minarini et al. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2017. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1251580>.
13. N-ацетилцистеин: фармакокинетические параметры и влияние на концентрацию эндогенных аминотиолов. А. А. Дутов и др. *Исследования фармакокинетики*. 2016. № 2. С. 26–30.
14. N-acetylcysteine reduces oxidative stress, nuclear factor-Kb activity and cardiomyocyte apoptosis in heart failure. Xiao-Yan Wu et al. *Molecular medicine reports*. 2014. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2292>.
15. Беленичев И. Ф., Кучер Т. В. Влияние тиольных антиоксидантов на состояние нитрозирующего стресса в головном мозге крыс, подверженных хронической алкогольной интоксикации. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2016. № 2 (48). С. 24–29.
16. N-acetylcysteine versus progesterone on the cisplatin-induced peripheral neurotoxicity. S. M. Zaki et al. 2018. *Folia Morphol*. № 2. <https://doi.org/10.5603/FM.a2017.0090>.
17. Sex-specific effects of N-acetylcysteine in neonatal rats treated with hypothermia after severe hypoxia-ischemia. Xingju Nie et al. 2016. *Neuroscience Research*. V. 108. P. 24–33.
18. Литвиненко Е. С., Беленичев И. Ф. Модуляция активности сопряженных систем NO/глутатион в ишемизированном головном мозге экспериментальных животных препаратом «селеназа» в различных дозах. *Вестник новых медицинских технологий*. 2015. Т. 22, № 1. С. 33–38.
19. Melatonin and human mitochondrial diseases. R. Sharafati-Chaleshtori et al. *Journal of research in medical sciences*. 2017. <https://doi.org/10.4103/1735-1995.19909>.
20. Іванків Я. І., Олещук О. М. Застосування мелатоніну при експериментальному цукровому діабеті I типу. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2016. № 3 (49). С. 41–47.
21. Арушанян Э. Б., Щетинин Е. В. Мелатонин как универсальный модулятор любых патологических процессов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016. Т. 60, № 1. С. 79–88.
22. Про захист тварин від жорстокого поводження [Електронний ресурс]: Постанова Кабінету Міністрів України від 12.02.2006 № 3447-IV. URL: <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>.
23. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. URL: <http://conventions.coe.int/treaty/en/treaties/html/123.htm>.
24. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації; за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. Київ : Авіцена, 2001. 528 с.
25. Contribution of neuronal nitric oxide synthase to N-acetylcysteine-induced increase of NO synthase activity in the brain of normotensive and hypertensive rats. O. Pechanova et al. *Physiological pharmacology*. 2009. P. 21–25.
26. Kumar P., Swain M., Pal A. Hyperglycemia-induced inflammation caused down-regulation of 8-oxoG-DNA glycosylase levels in murine macrophages is mediated by oxidative-nitrosative stress-dependent pathways. *The international journal of biochemistry*. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.02.006>.
27. Study of superoxide- and NO-dependet protective mechanisms of N-acetylcysteine and Losartan in rat's aorta and liver under streptozotocin – induced type 1 diabetes mellitus. I. Sytnyk, A. Burlaka, A. Vovk, M. Khaityovych. *Science Rise: Pharmaceutical Science*. 2017. № 6. С. 25–31.
28. Paul R., Phukan B., Justin Thenmozhi A. Melatonin protects against behavioral deficits, dopamine loss and oxidative stress in homocysteine model of Parkinson's disease. *Life science*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.11.016>.

29. Leeboonngam T., Pramong R., Sae-Ung K. Neuroprotective effects of melatonin on amphetamine-induced dopaminergic fiber degeneration in the hippocampus of postnatal rats. *Journal of pineal research*. 2018. <https://doi.org/10.1111/jpi.12456>.
30. Ji M., Xia D., Zhu L. Short- and Long-Term Protective Effects of Melatonin in a Mouse Model of Sepsis-Associated Encephalopathy. *Inflammation*. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0708-0>.
31. Gomaa A., Galal H., Abou-Elgait A. Neuroprotective effects of melatonin administration against chronic immobilization stress in rats. *International journal of physiology, pathophysiology, pharmacology*. 2017. V. 9, № 2. P. 16–27.
32. Li B. Effect of melatonin on attenuating the isoflurane-induced oxidative damage is related to PKC $\alpha$ /Nrf2 signaling pathway in developing rats. *Brain research bulletin*. 2018. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.09.018>.
33. Доклінічне вивчення специфічної активності потенційних лікарських засобів первинної та вторинної нейропротекції: методичні рекомендації; І. С. Чекман та ін. Київ, 2016. 93 с.
34. Electron paramagnetic resonance in the experimental oncology: implementation examples of the conventional approaches. A. P. Burlaka et al. *BioNanoScience*. 2016. № 6 (4). P. 431–436.
35. Гимерх Ф. И. К определению глутатиона крови. *Лабораторное дело*. 1967. № 9. С. 564–566.
36. Метод определения активности каталазы. М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев. *Лабораторное дело*. 1988. № 1. С. 16–19.
37. Порушення у системі церулоплазмін-трансферин у хворих на рак прямої кишки. А. П. Бурлака, І. І. Ганусевич, В. В. Голотюк та ін. *Онкологія*. 2014. № 3. С. 206–210.
38. Adav S. S., Park J. E., Sze S. K. Quantitative profiling brain proteomes revealed mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Molecular brain*. 2019. № 1. URL: <http://dx.doi.org/10.1186/s13041-019-0430-y>.
39. Ifhar L. S., Ene H. M., Ben-Shachar D. Impaired heme metabolism in schizophrenia-derived cell lines and in a rat model of the disorder: Possible involvement of mitochondrial complex I. *European neuropsychopharmacology*. 2019. № 5 (29). URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2019.03.011>.
40. Beneficial effects of N-acetylcysteine on hepatic oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. L. R. Rosa et al. *Canadian Journal of physiology and pharmacology*. 2018. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2017-0559>.
41. Mitochondrial Perturbation Contributing to Cognitive Decline in Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetic Rats. Y. Zhou et al. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018. V. 46, № 4. P. 1668–1682.
42. N-Acetylcysteine improves mitochondrial function and ameliorates behavioral deficits in the R6/1 mouse model of Huntington's disease. D. J. Wright et al. *Translation psychiatry*. 2015. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.131>.
43. Al-Nahdi T., John A., Raza H. Cytoprotective Effects of N-Acetylcysteine on Streptozotocin-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in RIN-5F Pancreatic  $\beta$ -Cells. *International journal of experimental cellular physiology, biochemistry and pharmacology*. 2018. № 1.
44. Ji M., Xia D., Zhu L. Short- and Long-Term Protective Effects of Melatonin in a Mouse Model of Sepsis-Associated Encephalopathy. 2018. *Inflammation*. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0708-0>.
45. N-acetyl-L-cysteine attenuates oxidative damage and neurodegeneration in rat brain during aging. G. Garg, S. Singh, A. Singh, S. Rizvi. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2018. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2018-0209>.
46. Sex-specific effects of N-acetylcysteine in neonatal rats treated with hypothermia after severe hypoxia-ischemia. *Neuroscience research*. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2016.01.008>.
47. Vishnoi S., Raisuddin S., Parvez S. Glutamate Excitotoxicity and Oxidative Stress in Epilepsy: Modulatory Role of Melatonin. *Journal of environmental pathology, toxicology, oncology*. 2016. <https://doi.org/10.1615/JenvironPatholToxicolOncol.2016016399>.

**О. А. Темірова, М. В. Хайтович, А. П. Бурлака, А. В. Вовк**  
**Модифікуючий вплив N-ацетилцистеїну, мелатоніну та їхнього поєднання**  
**на стан електронно-транспортного ланцюга мітохондрій та антиоксидантної**  
**системи в головному мозку щурів за експериментального**  
**цукрового діабету 1 типу**

*Мета дослідження* – вивчення впливу N-ацетилцистеїну (НАЦц), мелатоніну (Мел) та їхнього поєднання на стан електронно-транспортного ланцюга (ЕТЛ) мітохондрій та антиоксидантної системи в головному мозку щурів за експериментального цукрового діабету (ЦД) 1 типу.

Дослідження проведені на щурах-самцях лінії Wistar. ЦД1 моделювали шляхом введенням стрептозоточину. Щури з індукованим ЦД1 отримували НАЦц (1500 мг/кг), Мел (10 мг/кг) та їхнє поєднання протягом 5 тижнів, починаючи з 15 доби після відтворення контрольної патології.



Згідно з результатами експериментальних досліджень, отриманих на моделі ЦД1 у щурів, було виявлено порушення ЕТЛ мітохондрій клітин головного мозку. Так, встановлене значне зменшення залізо-сірчаних білків у 4,6 разу ( $p < 0,05$ ), а також радикалів убихінону в 2,5 разу ( $p < 0,05$ ), тоді як рівень нітрозольних комплексів заліза зріс у 1,2 разу ( $p < 0,05$ ) порівняно з групою інтактного контролю. Поєднане застосування НАцц і Мел у щурів зі стрептозотоциновим ЦД1 попереджувало зменшення рівня залізо-сірчаних білків і радикалів убихінону (у 2,0 разу порівняно з групою контрольної патології,  $p < 0,05$ ), сприяючи нормалізації ЕТЛ мітохондрій і виявляючи тим самим антиоксидантний і антиапоптотичний вплив на клітини головного мозку. Застосування комплексу НАцц і Мел виявило найкращий антирадикальний ефект, сприяючи зниженню рівня генерування супероксидних радикалів у 1,7 разу ( $p < 0,05$ ). Зростання рівня NO в 2,0 разу ( $p < 0,05$ ) можливо пов'язане з нормалізацією активності ендотеліальної NO-синтази в разі застосування комплексу даних лікарських засобів.

Монотерапія НАцц і Мел була більш ефективною на кінцевих етапах оксидативного стресу. Зокрема, введення НАцц супроводжувалося зростанням у 1,8 разу рівня відновленого глутатіону ( $p < 0,05$ ), тоді як Мел підвищував у 1,6 разу активність каталази ( $p < 0,05$ ).

Окрім того, вказані лікарські засоби, особливо в разі їхнього поєданого застосування, нормалізували антиоксидантний захист крові щурів з ЦД1, про що свідчило наближення рівня трансферину, церулоплазміну та метгемоглобіну до значень інтактного контролю ( $p < 0,05$ ).

*Ключові слова:* цукровий діабет 1 типу, N-ацетилцистеїн, мелатонін, мітохондрії, супероксидний радикал, глутатіон, каталаза

**Е. А. Темирова, М. В. Хайтович, А. П. Бурлака, А. В. Вовк**  
**Модифицирующее влияние N-ацетилцистеина, мелатонина и их сочетания на состоянии электронно-транспортной цепи митохондрий и антиоксидантной системы в головном мозге крыс при экспериментальном сахарном диабете 1 типа**

Сахарный диабет (СД) является проблемой медико-социального и общечеловеческого значения. Почти у 80 % пациентов с СД встречается диабетическая энцефалопатия (ДЭ), что приводит к существенному ухудшению качества жизни. Основным фактором развития ДЭ при СД 1 типа (СД1) считается оксидативный стресс (ОС). Так, активация ОС, вызванного гипергликемией, вызывает избыточное образование реактивных форм кислорода и истощение системы антиоксидантной защиты, что приводит к энергетическому истощению и, как следствие, повреждению и гибели нейронов. Поэтому коррекция ОС считается одним из самых перспективных направлений церебропротекции при СД1.

*Цель исследования* – изучить влияние N-ацетилцистеина (НАцц), мелатонина (Мел) и их сочетания на состояние электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий и антиоксидантной системы в головном мозге крыс при экспериментальном СД1.

Исследования проведены на крысах-самцах линии Wistar. СД1 моделировали путем введения стрептозотоцина. Крысы с индуцированным СД1 получали НАцц (1500 мг/кг), Мел (10 мг/кг) и их комбинацию в течение 5 недель, начиная с 15 суток после воспроизведения контрольной патологии.

Согласно результатам экспериментальных исследований, полученным на модели СД1 у крыс, были выявлены нарушения ЭТЦ митохондрий клеток головного мозга. Так, установлено значительное уменьшение железосерных белков в 4,6 раза ( $p < 0,05$ ), а также радикалов убихинона в 2,5 раза ( $p < 0,05$ ), тогда как уровень нитрозольных комплексов железа вырос в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ). Совместное применение НАцц и Мел у крыс со стрептозотоциновым СД1 предупреждало снижение уровня железосерных белков и радикалов убихинона (в 2,0 раза по сравнению с группой контрольной патологии,  $p < 0,05$ ), способствуя нормализации ЭТЦ митохондрий и проявляя тем самым антиоксидантное и антиапоптотическое влияние на клетки головного мозга. Применение комплекса НАцц и Мел имело лучший антирадикальный эффект, способствуя снижению уровня генерирования супероксидных радикалов в 1,7 раза ( $p < 0,05$ ). Рост уровня NO в 2,0 раза ( $p < 0,05$ ) возможно связан с нормализацией активности ендотеліальної NO-синтази при совместном применении данных лекарственных средств.

Монотерапія НАцц і Мел була більш ефективною на кінцевих етапах ОС. В частности, введення НАцц супроводжувалося ростом в 1,8 разу рівня відновленого глутатіону ( $p < 0,05$ ), тоді як Мел підвищував у 1,6 разу активність каталази ( $p < 0,05$ ).

Указанные лекарственные средства, особенно при совместном применении, нормализовали показатели антиоксидантной защиты в крови у крыс с СД1, о чем свидетельствовало приближение уровня трансферрина, церулоплазмина и метгемоглобина ( $p < 0,05$ ) к значениям интактного контроля.

*Ключевые слова:* сахарный диабет 1 типа, N-ацетилцистеин, мелатонин, митохондрии, супероксидный радикал, глутатіон, каталаза

---

**O. A. Temirova, M. V. Khaitovych, A. P. Burlaka, A. V. Vovk**  
**The modifying effect of N-acetylcysteine, melatonin and their combination**  
**on the state of the mitochondrial electron transport chain and antioxidant system**  
**in the rat brain at experimental diabetes type 1**

Diabetes mellitus (DM) is an importance medico-social problem. Almost 80 % of patients with diabetes have diabetic encephalopathy (DE) which leads to a significant impairment in the quality of life. Oxidative stress (OS) is considered to be a major factor in the development of DE in type 1 diabetes (DM1). Thus, hyperglycemia-induced OS causes excessive formation of reactive oxygen species and depletion of the antioxidant protection system which lead to energy depletion and, as a result, neuronal damage and death. Therefore, OS correction is considered to be one of the most promising areas of cerebroprotection in DM1.

*The purpose of the study* was to investigate the effect of N-acetylcysteine (NAC), melatonin (Mel) and their combination on the state of mitochondrial electron transport chain (ETC) and antioxidant (AO) system in rats' brain with experimental DM1

Experiments were carried out on male Wistar rats. DM1 was induced by administration of streptozotocin (STZ). Rats with induced DM1 received NAC (1500 mg/kg), Mel (10 mg/kg) and their combination during 5 weeks, starting at 15 days after control pathology (CP) was reproduced.

According to the results of experimental studies, obtained in the rats' with DM1 model, disruption of mitochondrial ETC in brain cells was detected. Thus, it was found a significant decrease of sulfur-iron proteins in 4,6-times ( $p < 0,05$ ) and ubiquinone radicals in 2,5-times ( $p < 0,05$ ), while the level of iron nitrosol complexes was increased in 1,2-times ( $p < 0,05$ ) to intact control values.

The combined effect of NAC and Mel in rats with streptozotocin DM1 prevented the decreasing in the level of sulfur-iron proteins and ubiquinone radicals (by 2,0-times compared with control pathology group,  $p < 0,05$ , contributing to the normalization of mitochondrial ETC and thereby exhibiting antioxidant and antiapoptotic effects in brain cells. Joint use of the NAC and Mel showed the best antiradical effect reducing superoxide radicals generation by 1,7-times ( $p < 0,05$ ). An increase of NO level by 2,0-times ( $p < 0,05$ ) indicates the endothelial protective effect of this medicines combination and. may be associated with a normalization of endothelial NO synthase activity.

Monotherapy of NAC and Mel was more effective in the final stages of OS. In particular, the administration of NAC was accompanied with increasing of the reduced glutathione level by 1,8-times ( $p < 0,05$ ), whereas melatonin led to increase of catalase activity by 1,6-times ( $p < 0,05$ ) versus CP group.

These medicines, especially in combination, normalized the AO system indices in the blood of rats with DM1, as evidenced by the approximation of transferrin, ceruloplasmin, and methemoglobin levels ( $p < 0,05$ ) to intact control values.

*Key words:* type 1 diabetes mellitus, N-acetylcysteine, melatonin, mitochondria, superoxide radical, glutathione, catalase

---

Надійшла: 29 серпня 2019 р.

Прийнята до друку: 16 жовтня 2019 р.

**Контактна особа:** Темірова Олена Анатоліївна, асистент, кафедра клінічної фармакології та клінічної фармації, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, буд. 43, вул. Володимирська, м. Київ. Тел.: + 38 0 67 909 90 65. Електронна пошта: lfitsner@gmail.com