

UDC 616.718+616-005.4+616-008.6-08:615.3:616-092.4

THE PATHOGENETIC SUBSTANTIATION OF EFFICIENCY OF DRUG CORRECTION OF THE EXPERIMENTAL REPERFUSION SYNDROME BY COMBINED APPLICATION OF PROTEOLYSIS INHIBITORS AND ANTIOXIDANTS

M.I.Fedosov, L.V.Anisimova, A.V.Kubyshekin

Crimean State Medical University named after S.I. Georgievsky

Key words: reperfusion; proteinases; cytokines; proteinase inhibitors; antioxidants

Recently for the treatment of reperfusion syndrome (RS) the use of inhibitors of proteolysis and antioxidants is more often recommended. This is due to the fact that today pathogenesis of RS is considered from the standpoint of development of the systemic inflammatory response syndrome, which occurs with the excessive activation of the proteolytic enzymes, cytokines and other inflammatory mediators. In this regard, it seems appropriate to have simultaneous exposure to the pathogenetic links mentioned. However, at present the possibility of the combined use of these drugs to potentiate their effect and simultaneous influence on different links in the pathogenesis of RS, as well as their influence on the reactions of cytokine homeostasis are not understood well. The aim of this study was to provide the pathogenetic substantiation of efficiency of the combined use of inhibitors of proteolysis ("Gordox" medicine, 20 000 IU/kg) and antioxidants ("Corvitin" medicine, 10 mg/kg) for drug correction of the experimental RS. The combined use of inhibitors of proteolysis and antioxidants for correction of the experimental drug RS is most effective in reducing the total proteolytic activity and concentrations of major pro-inflammatory cytokines in the blood serum compared to the effects of monotherapy due to the simultaneous effect on several main pathogenetic links of RS and potentiation of the effects of the drugs used.

Recently for the treatment of reperfusion syndrome (RS) the use of inhibitors of proteolysis and antioxidants is more often recommended [1, 7]. This is due to the fact that in the pathogenesis of RS the leading role is played by the excessive activation of the proteolytic enzymes, cytokines and other inflammatory mediators. The excessive activation of biologically active substances in critical conditions are increasingly interpreted in terms of development of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS resulting in changes of homeostasis with dysfunction of the kallikrein-kinin system, blood coagulation and complement systems [2, 3, 5, 6, 8-10].

It is believed that medicines of the group of proteolysis inhibitors (aprotinin) reduce the total proteolytic activity, inhibit the kallikrein-kinin system, have hemostatic and antifibrinolytic effects. Of the drugs that have the antioxidant effect, quercetin is quite often used in critical conditions, its effect is due to decrease of cy-

totoxic superoxide anion production, blocking of the lipoxygenase pathway of leukotrienes synthesis, which is accompanied by the inhibitory effect on the membranotropic enzymes involved in degradation of the cell membrane phospholipids. However, nowadays the use of these medicines for correction of reperfusion disorders is a subject of debate, and the possibility of their combined use for the simultaneous influence on different links in the pathogenesis of RS is still under study.

In this connection, the aim of this work was to provide the pathogenetic substantiation of efficiency of the combined use of inhibitors of proteolysis and antioxidants for drug correction of the experimental RS.

Materials and Methods

Experiments were carried out on 58 white Wistar male rats with the body weight of 180-210 g in accordance with the principles of bioethics. The ischemia-reperfusion syndrome was simulated by

applying rubber bands on both hind limbs at the level of the inguinal fold for the period of 6 hours. The width of the clamped tissues was 2-3 mm. Indication of the correctness of the tourniquet's application was the absence of edema of the limbs and their pale colouring. Revascularization was performed at once by dissection of the rubber bands after six-hour application [1].

Animals were euthanized in 12 hours after reperfusion under thiopental anesthesia by decapitation; then the blood sampling was taken for research. Each group of animals with RS without treatment and on the background of treatment included 12 rats. The group of intact animals (n = 10) was as the control group.

Treatment of the experimental animals was performed in different way for three groups: the first group was treated with the proteolysis inhibitor ("Gordox" medicine (Gedeon Richter, Hungary)) in the dose of 20,000 IU/kg of the body weight, the second group had the treatment with the antioxidant (a water soluble form of quercetin, "Corvitin" medicine (Borshcha-

Table 1

Changes in the protease-inhibitor blood system of rats in development of the ischemia-reperfusion syndrome under the drug correction ($M \pm m$)

Group	ELA, mcM/ml·min	TLA, IU/ml	α -1-IP	ASI
Control (n=10)	2.19±0.14	0.26±0.02	34.67±1.57	6.83±0.30
RS, 12 h (n=12)	0.41±0.02*	0.73±0.06*	25.76±1.76	3.39±0.30*
RS + "Gordox" (n=12)	1.17±0.08*	0.44±0.02*	28.48±2.23	5.35±0.37**
RS + "Corvitin" (n=12)	1.13±0.13*	0.29±0.07*	22.95±2.18	5.22±0.41**
RS + "Corvitin" + "Gordox" (n=12)	1.18±0.09*	0.21±0.03*	36.26±2.17**	6.93±0.57*

Note: An asterisk indicates reliability of differences in relation to the control group: * – $p < 0.001$, ** – $p < 0.01$, n – the number of animals.

hiv CPP, Ukraine)) 10 mg/kg of the body weight, the third one received the combination of the proteolysis inhibitor and the antioxidant (in appropriate doses). The drugs were introduced intraperitoneally to all experimental animals with a single dose 30 minutes before revascularization of the limbs.

Determination of activity of the components of the protease-inhibitor system were carried out using enzymatic methods [4] on a "Biomat 5" spectrophotometer (UK). The trypsin-like activity (TLA) was measured by the rate of elimination of N-benzoyl-L-arginine from the synthetic substrate of ethyl ester of N- α -benzoyl-L-arginine ethyl ester hydrochloride (BAEE) (Sigma).

Determination of elastase-like activity (ELA) was based on the study of the hydrolysis rate of a synthetic substrate Boc-L-alanine-4-nitrophenyl ester (Boc-Ala-ONp) (Sigma). Determination of the concentration of alpha-1-proteinase inhibitor (α -1-IP) was performed measuring the inhibition of the trypsin-caused decomposition of BAEE. Similarly the activity of acid-stable inhibitors (ASI) was determined after pretreatment of the serum by warming in the acidic medium.

Identification of the concentration for major pro-inflammatory cytokines, IL-1 β , IL-6 and TNF- α was performed by the solid phase enzyme immunoassay using kits of reagents manufactured by "Ray-

Table 2

Changes in the system of cytokines in the blood of rats in development of the ischemia-reperfusion syndrome under the drug correction ($M \pm m$)

Group	IL-1 β , pg/ml	IL-6	TNF- α
Control (n=10)	555.2±40.3	28.2±5.5	4.4±0.8
RS, 12 h (n=12)	5303.8±289.5	670.1±49.0	71.1±11.0
RS + "Gordox" (n=12)	1440.1±47.4	153.1±22.4	13.3±13.3
RS + "Corvitin" (n=12)	1276.4±61.8	270.2±48.9	18.6±4.4
RS + "Gordox" + "Corvitin" (n=12)	518.5±21.9	164.7±127.6	15.4±1.5

Note: reliability of differences in relation to the control group for all values of $p < 0.001$. n – the number of animals.

Bio" (USA). The results were recorded using a microplate scanner with the wavelength of 450 nm.

Statistical data processing was carried out using the methods of variation statistics with the calculation of the mean values (M), estimation of the probabilities of discrepancies (m), estimation of the reliability of changes using the Student's t-test. Difference between the mean values was taken as the reliable difference with $p < 0.05$.

Results and Discussion

As is shown in our earlier studies, development of RS is accompanied by activation of the non-specific protease activity with simultaneous inhibition of activity of their inhibitors and increased concentrations of the major pro-inflammatory cytokines in the blood serum. All these changes are maximally expressed in 12 hours after reperfusion [5].

Drug correction of the experimental RS showed that the combined use of proteolysis inhibitors and the antioxidant led to the most effective reduction of the severity of changes of the parameters studied (Table 1). For example, TLA after the proteolysis inhibitor monotherapy decreased by 1.7 times, after the antioxidant monotherapy – by 1.5 times, and after the combined use of the drugs – 3.5 times as compared to the untreated group. α -1-IP reached its maximum value with the combined use of the proteolysis inhibitor and the antioxidant, becoming 1.3 times higher compared to the proteolysis inhibitor monotherapy and more than 1.5 times higher in comparison with the antioxidant monotherapy. A similar trend was observed in the dynamics of the ASI-activity.

In the system of pro-inflammatory cytokines the most effective reduction of the concentration of IL-1 β more than 10 times compared to the untreated group was achieved in the case of the combined use of the proteolysis inhibitor and the antioxidant (Table 2). However, the concentration of IL-6

and TNF- α in the case of the proteolysis inhibitor monotherapy, as well as in the case of the combined therapy decreased approximately four times compared to the untreated group.

These experimental data show that the combined use of proteolysis inhibitors and antioxidants

is more effective in comparison with monotherapy. Efficiency of using such combination is explained by the simultaneous influence on several major pathogenetic mechanisms and is confirmed by an effective reduction in the total proteolytic activity and concentrations of the major pro-in-

flammatory cytokines in the blood serum. The use of antioxidant promotes the protection of the proteolysis inhibitor from oxidative damage, thereby potentiating the efficiency of the latter, and the use of a water soluble form of quercetin promotes more rapid achievement of the therapeutic effect.

REFERENCES

1. Алиев Л.Л., Харченко В.З., Кубышкин А.В. // Таврический мед.-биол. вестник. – 2008. – Т. 11, №1. – С. 64-69.
2. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А. // Патол. физиол. и эксперим. терапия. – 2012. – №4. – С. 3-14.
3. Кубышкин А.В., Фомочкина И.И. // Вестник С.Пб.ГУ. – 2011. – №3. – С. 69-75.
4. Методы определения активности неспецифических протеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови и биологических жидкостях: Метод рекоменд. / Изд. А.В.Кубышкин. – К., 2010. – 28 с.
5. Федосов М.И., Фомочкина И.И., Кубышкин А.В. и др. // Таврический мед.-биол. вестник. – 2012. – Т. 15, №3, ч. 1. – С. 354-357.
6. Douvas S., Kolokotronis A., Stefanopoulos P. // Infection and Immunity. – 2005. – Vol. 73 (3). – P. 1271-1274.
7. Hayama T., Matsuyama K., Funao M. // Transplant. Proc. – 2006. – Vol. 38 (7). – P. 2201-2203.
8. Knight S., Johns E.J. // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2008. – Vol. 35 (1). – P. 11-16.
9. Koseki K. // Rinsho Byori. – 2011. – №147. – P. 13-19.
10. Rossi A., Pergola C., Cuzzocrea S. et al. // Sci. World J. – 2007. – Vol. 7. – P. 56-74.

Address for correspondence:

5/7, Lenin boulevard, Simferopol, 95006, Ukraine.

Tel. (95) 078-86-64. E-mail: mifedosov@mail.ru.

Crimean State Medical University named after S.I. Georgievsky

Received in 07.10.2013

ПАТОГЕНЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ КОРЕКЦІЇ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РЕПЕРФУЗІЙНОГО СИНДРОМУ ПОЄДНАНИМ ЗАСТОСУВАННЯМ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕОЛІЗУ ТА АНТИОКСИДАНТІВ

М.І.Федосов, Л.В.Анисимова, А.В.Кубышкин

Кримський державний медичний університет ім. С.І.Георгієвського

Ключові слова: реперфузія; протеїнази; цитокіни; інгібітори протеолізу; антиоксиданти

Останнім часом для лікування реперфузійного синдрому (РС) все частіше рекомендується використання інгібіторів протеолізу та антиоксидантів. Це пов'язано з тим, що на сучасному етапі патогенез РС, як і більшості критичних станів, розглядається з позицій розвитку синдрому системної запальної реакції, при якому виникає надмірна активність протеолітичних ферментів, прозапальних цитокінів та інших медіаторів запалення. У зв'язку з цим представляється доцільним одночасний вплив на перелічені ланки патогенезу. Однак, на сьогоднішній день можливість одночасного застосування вказаних препаратів з метою потенціювання їх ефекту і одночасного впливу на різні ланки патогенезу РС, а також їх вплив на реакції цитокінового гомеостазу вивчені недостатньо. Метою цього дослідження було патогенетичне обґрунтування ефективності поєданого застосування інгібіторів протеолізу і антиоксидантів для медикаментозної корекції експериментального РС. РС моделювали шляхом накладення гумових джгутів на обидві задні кінцівки щурів на рівні пахової складки строком на 6 годин. Лікування проводили посерійно з використанням інгібіторів протеолізу (препарату «Гордокс» у дозі 20000 ОД/кг), антиоксидантів (препарату «Корвітин» у дозі 10 мг/кг) та їх комбінації у відповідних дозах. Отримані результати показали, що при одночасному застосуванні інгібіторів протеолізу і антиоксидантів для медикаментозної корекції експериментального РС відзначається найбільш ефективне зниження сумарної протеолітичної активності і концентрації основних прозапальних цитокінів у сироватці крові порівняно з ефектами від монотерапії, що обумовлено одночасним впливом на кілька основних патогенетичних ланок РС і покращенням ефекту від використаних препаратів.

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕДИКАМЕНТОЗНОЙ КОРРЕКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РЕПЕРФУЗИОННОГО СИНДРОМА СОЧЕТАННЫМ ПРИМЕНЕНИЕМ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕОЛИЗА И АНТИОКСИДАНТОВ

М.И.Федосов, Л.В.Анисимова, А.В.Кубышкин

Крымский государственный медицинский университет им. С.И.Георгиевского

Ключевые слова: реперфузия; протеиназы; цитокины; ингибиторы протеолиза; антиоксиданты

В последнее время для лечения реперфузионного синдрома (РС) всё чаще рекомендуется использование ингибиторов протеолиза и антиоксидантов. Это связано с тем, что на современном этапе патогенез РС, как и боль-

шинства критических состояний, рассматривается с позиций развития синдрома системной воспалительной реакции, при котором происходит чрезмерная активация протеолитических ферментов, провоспалительных цитокинов и других медиаторов воспаления. В связи с этим представляется целесообразным одновременное воздействие на перечисленные звенья патогенеза. Однако, на сегодняшний день возможность сочетанного применения указанных препаратов с целью потенцирования их эффекта и одновременного воздействия на различные звенья патогенеза РС, а также их влияние на реакции цитокинового гомеостаза изучены недостаточно. Целью настоящего исследования явилось патогенетическое обоснование эффективности сочетанного применения ингибиторов протеолиза и антиоксидантов для медикаментозной коррекции экспериментального РС. РС моделировали путём наложения резиновых жгутов на обе задние конечности крыс на уровне паховой складки сроком на 6 часов. Лечение осуществляли посерийно с использованием ингибиторов протеолиза (препарата «Гордокс» в дозе 20000 ЕД/кг), антиоксидантов (препарата «Корвитин» в дозе 10 мг/кг) и их комбинации в соответствующих дозировках. Полученные результаты показали, что при сочетанном применении ингибиторов протеолиза и антиоксидантов для медикаментозной коррекции экспериментального РС отмечается наиболее эффективное снижение суммарной протеолитической активности и концентрации основных провоспалительных цитокинов в сыворотке крови сравнительно с эффектами от монотерапии, что обусловлено одновременным воздействием на несколько основных патогенетических звеньев РС и потенцированием эффекта от использованных препаратов.