© Олійник Т. М., Савосько С. І., Чайковський Ю. Б.

УДК 612. 824. 4:577. 325. 6

Олійник Т. М., Савосько С. І., Чайковський Ю. Б.

МЕТАБОЛІЧНІ ЗМІНИ КОРИ ВЕЛИКОГО МОЗКУ ЩУРІВ ПІСЛЯ МОДЕЛЮВАННЯ ГЕМОРАГІЧНОГО ІНСУЛЬТУ

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця (м. Київ)

savosko_s@ukr.net

Дослідження є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри гістології та ембріології «Органи неврології, імунології та сечостатевої системи в умовах експериментального пошкодження», № державної реєстрації 0112U001413.

Вступ. Одним із частих і найбільш прогнозованих несприятливих судинних захворювань головного мозку є інсульт, в структурі якого 80-90 % складають ішемічний тип, але смертність від геморагічного інсульту в 1,5 рази вище [16]. На сучасному етапі розвитку фармакології і фундаментальної нейрофізіології запропоновано велику кількість лікарських засобів для корекції розвитку ішемічного ураження нервових клітин (ексайтотоксичності). Велика увага приділяється ефективності нейропротекторних, антигіпертензивних та протинабрякових засобів [5,13]. Проте залишаються недостатньо вивченими механізми нейропротекції та причини неефективної корекції метаболічних розладів після перенесеного інсульту [6,8].

В даному дослідженні наводяться дані метаболічних порушень при геморагічному інсульті, роль артеріальної гіпертензії в цих розладах та можливості впливу на активність ферментативних систем шляхом застосування нейротрофічного (BDNF), антигіпертонічного (сульфат магнію), діуретичного (торасемід) і антиоксидантного (корвітин) засобів, їх комбінації.

Мета дослідження – оцінка змін антиоксидантних ферментативних систем кори великого мозку при інсульті, продукції продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) і їх нормалізації при застосуванні лікарських засобів різних фармакологічних груп, аналіз ефективності фармакокорекції при інсульті на тлі артеріальної гіпертензії.

Об'єкт і методи дослідження. Експериментальні дослідження проведені на 120 щурах-самцях (середня маса 205,3 ± 6,6г). Відтворення обмеженого крововиливу у тварин досягали механічним руйнуванням тканини внутрішньої капсули (C. I. dextra, L = 3,5-4,0; H = 6,0; AP = 0,6-1,0) [21] 4-6 обертальними рухами зігнутого мандрена-ножа, з подальшим введенням в ділянку внутрішньої капсули (через 3-4 хв після руйнування) 0,15-0,2 мл аутокрові [19]. Премедикацію здійснювали шляхом введення тіопенталу натрію (і. р., 50 мг/кг). Після моделювання геморагічного інсульту внутрішньоочеревинно вводили лікарські засоби нормотензивним щурам (WKY) і щурам із спонтанною артеріальною гіпертензією (САГ) за схемою та дозами, що наведені в **таблиці 1.**

Таблиця 1

Схема введення та дозування препаратів

Препарат	Доза	Частота, кількість введення
BDNF	20 мкг/щура (80 мкг/кг)	Через 2 години і на 3 добу після інсульту
$MgSO_4$	10 мл/добу (0,15 мл/кг)	Через 2 години після інсульту і у наступні 5 діб раз на добу
Корвітин	500 мг/добу (7,2 мг/кг)	
Торасемід	10 мг/добу (0,15 мг/кг)	
Комбінація засобів	*	*

Примітка: * – в групі комбінованої фармакокорекції досліджувані засоби застосовували в дозі і схемах, що наведено для їх ізольованого введення.

Виведення дослідних тварин із експерименту здійснювали на 10 добу після моделювання геморагічного інсульту. Тварин наркотизували тіопенталом натрію (і. р., 60 мг/кг) і декапітували. Із фрагментів кори великого мозку щурів готували гомогенати для біохімічного дослідження. Наважку кори мозку (100 мг) (попередньо висушеної на фільтрувальному папері), гомогенізували за допомогою електричного гомогенізатора Glas-Col (США) в 1 мл охолодженого 0,05 М фосфатного буфера з 0,1 мМ ЕДТА (pH 7, 6). Концентрацію білка визначали за методом Lowry [18]. Активність ферментів визначали в супернатантах, отриманих центрифугуванням гомогенатів при 10 000 g протягом 20 хв, за допомогою відомих спектрофотометричних методів з використанням спектрофотометра μQuant, Bio-Tek, (США). Активність каталази (CAT) визначали за методом Aebi [1], супероксиддисмутази (SOD) за методом, що описано в роботі Mirsa H. [20], а DT-діафорази за методом із публікації Petrova G. [22]. Концентрацію

малонового діальдегіду (MDA) визначали в гомогенатах кори мозку за методом Uchiyama [26], дієнових кон'югатів (DC) за методом, що описаний в статті Janero D. [7].

Експериментальні маніпуляції проводили відповідно до правил "Regulations on the animal use of in research biomedical research", "European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes" і "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals".

Статистичну обробку отриманих вибірок даних проводили із застосуванням програми Statistica 6.0. Вибірки порівнювали за допомогою непараметричного критерію Манна-Уітні.

Результати досліджень та їх обговорення. Гіпоксія продукує велику кількість активних форм кисню (АФК), які ушкоджують макромолекули і наносять вторинне ушкодження клітинам головного мозку. Індуковані інсультом зміни структурної організації та функціонального стану нейронів та нейроглії можуть бути пов'язані з порушеннями системи біотрансформації ендогенних сполук та продуктів проміжного обміну, що утворюються в результаті розщеплення окисного фосфорилювання в мітохондріях. Одними з найменш вивчених механізмів біотрансформації мітохондріальних хінонів та ксенобіотиків є такі, що відбуваються за участю NAD(P)H-хінон-оксидоредуктази (DT-діафораза). DT-діафораза є одним із основних клітинних ферментів, що забезпечують нейтралізацію токсичних органічних похідних та гідроксилювання хінонів енергетичного ланцюга в кристах мітохондрій.

За участю DT-діафорази здійснюється транспорт електронів через мембрану крист для нейтралізації протонів, які постійно видаляються для уникнення ацидозу з клітини протонним насосом (H^+-ATPазою). Одночасно з цим гідрофільні хінони під дією DT-діафорази та у присутності NADH, відновлюються до гідрохінонів і далі окислюються в комплексі III дихального ланцюга в обхід комплексу I, що нормалізує роботу дихального ланцюга мітохондрій та запобігає окисненню ліпідів плазматичних мембран [11,17]. Проте одним із кінцевих продуктів реакції є перекис водню (H_2O_2), що в низьких концентраціях є внутрішньоклітинним посередником, а у високих окислює ліпіди мембран [9]. Проте сучасні дані свідчать, що за умов ішемії зростання експресії DT-діафорази є компенсаторною цитопротекторною реакцією клітин на гіпоксію [3, 5].

Проведені нами експериментальні дослідження показали, що у щурів із геморагічним інсультом на 25,9% ($p<0,05$) зростає активність DT-діафорази, разом із тим у гіпертензивної лінії щурів із інсультом достовірно різниці із контрольним показником не встановлено, хоча вихідна активність DT-діафорази у гіпертензивних щурів вища порівняно із нормотензивними на 64,1% ($p<0,05$) (**табл. 2**). Ці дані свідчать про те, що артеріальна гіпертензія супроводжується активацією компенсаторних механізмів метаболічних перетворень мітохондріальних хінонів, а при геморагічному інсульті активація DT-діафорази відбувається для відновлення хінонів в гідрохінони, що попереджає утворення цитотоксичних продуктів – семіхінонів.

Хоча DT-діафораза, як індуцибельний антиоксидантний ензим запобігає утворенню активних форм кисню (АФК), утворювані дигідрохінони самі можуть бути додатковим джерелом АФК [28]. Отже, виявлене посилення вільнорадикальних процесів при інсульті частково може пояснюватись зростанням активності даного ензиму.

Як відомо, надмірне утворення активних окиснених метаболітів є одним з ключових механізмів, що призводить до порушення функцій та загибелі клітин. Цитотоксична та мутагенна дія АФК обумовлюється посиленням процесів вільнорадикального (пероксидного) окиснення фізіологічно важливих макромолекул. Результати біохімічного аналізу змін інтегральних маркерних показників вільнорадикального окиснення біомолекул свідчать про істотну інтенсифікацію даного процесу за умов експериментального інсульту. Зокрема це стосується вмісту MDA та DC, які є кінцевими продуктами пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) і відносяться до цитотоксичних сполук, що викликають пошкодження біомембран, протеїнів і нуклеїнових кислот [4,10]. Встановлено, що рівень MDA в гомогенаті кори великого мозку щурів перевищував у 2,2 та 1,9 рази ($p<0,01$) відповідно за експериментального інсульту у WKY- і САГ-ліній, порівняно із показниками у щурів контрольної групи, а DC – у 1,5 і 1,9 разів ($p<0,01$) (**табл. 2**). При цьому рівень продукції MDA у інтактних гіпертензивних щурів був вищим на 67,1% порівняно із інтактними нормотензивними щурами, що свідчить про продукцію АФК та ПОЛ на тлі артеріальної гіпертензії і пояснює зазначений ступінь метаболічних змін.

Основними ферментативними системами, що забезпечують антиоксидантну функцію клітин є супероксиддисмутаза і каталаза. Ці ферменти каталізують дисмутацію супероксиду в кисень і перекис водню та наступне розщеплення останнього в молекулярний кисень і воду, а також окислюють в присутності перекису водню низькомолекулярні спирти та нітрити. Отримані нами результати показали, що при інсульті знижувалась активність SOD і CAT на 10,9% і 16,2% ($p<0,05$) у нормотензивних щурів і на 32,7% і 69,4% ($p<0,05$) у гіпертензивних. Тобто, геморагічний інсульт обтяжений артеріальною гіпертензією характеризується більш різким порушенням антиоксидантних ферментативних систем, що пояснює високий рівень утворення MDA і DC. В свою чергу підвищена активність каталази у гіпертензивних щурів є компенсаторним механізмом утилізації перекису водню, що утворюється при дисфункції дихального ланцюга мітохондрій при розладах артеріального тиску.

Аналіз метаболічних змін кори великого мозку щурів при інсульті та введенні фармакологічних засобів показав суттєву різницю між дією препаратів різного механізму дії. Так, у групі із BDNF встановлено активацію ферментів антиоксидантного профілю. Рівень SOD у нормотензивних щурів відновився до

Таблиця 2

Зміни активності ферментів антиоксидантного профілю та проміжних метаболітів кори великого мозку щурів при геморагічному інсульті (M ± m)

Група	Фермент і проміжні метаболіти				
	SOD U/mg/min prot	**CAT** mgmol/min prot	**DT-діафораза**, nmol/mg/min	**MDA**, nmol/mg prot.	**DC**, nmol/mg prot.
Нормотензивні щури лінії WKY					
Контроль	14,43 ± 0,21	1,54 ± 0,02	4,16 ± 0,14	7,16 ± 0,37	4,46 ± 0,39
ГІ	12,86 ± 0,28*	1,29 ± 0,05*	5,24 ± 0,24*	15,54 ± 1,05*	6,93 ± 0,87*
ГІ + BDNF	15,10 ± 0,24#	1,72 ± 0,10#	5,63 ± 0,21*	16,50 ± 1,00*	8,80 ± 0,59*
ГІ + $MgSO_4$	15,40 ± 0,30*#	1,53 ± 0,02#	5,66 ± 0,21*	16,80 ± 1,25*	9,12 ± 0,61*
ГІ + корвітин	12,8 ± 0,14*	1,52 ± 0,05#	5,18 ± 0,10*	12,63 ± 0,94*#	6,06 ± 0,34*
ГІ + торасемід	15,06 ± 0,17*#	1,75 ± 0,03*#	5,33 ± 0,31*	13,87 ± 1,05*	6,80 ± 0,49*
ГІ + комбінація	14,63 ± 0,65#	1,71 ± 0,04*#	4,36 ± 0,19#	11,40 ± 0,85*#	5,04 ± 0,31
Щури із САГ					
Контроль	15,10 ± 0,60	3,37 ± 0,25^	6,83 ± 0,21^	11,96 ± 0,90^	5,20 ± 0,34
ГІ	10,16 ± 0,76*^	1,03 ± 0,01*^	6,34 ± 0,23^	23,70 ± 1,91*^	10,34 ± 0,80*^
ГІ + BDNF	12,16 ± 1,11*^	1,65 ± 0,04*#	6,83 ± 0,22^	22,55 ± 1,93*^	10,45 ± 0,65*
ГІ + $MgSO_4$	11,33 ± 0,68*^	1,29 ± 0,04*#^	6,56 ± 0,29^	22,59 ± 1,80*^	10,63 ± 0,77*
ГІ + корвітин	15,20 ± 0,36#^	2,65 ± 0,04*#^	6,89 ± 0,26^	18,84 ± 1,33*#^	8,48 ± 0,66*#^
ГІ + торасемід	13,23 ± 0,59*#^	2,57 ± 0,03*#^	6,90 ± 0,24^	21,38 ± 1,77*^	8,30 ± 0,55*^
ГІ + комбінація	13,70 ± 0,84#	3,00 ± 0,06#^	6,87 ± 0,25^	18,61 ± 0,96*#^	7,96 ± 0,45*#^

Примітка: ГІ – геморагічний інсульт; * – достовірно до контролю ($p < 0,05$); # – достовірно до групи інсульт них щурів ($p < 0,05$); ^ – достовірно до нормотензивних щурів WKY-лінії ($p < 0,05$).

контрольного показника, а у гіпертензивних щурів збільшився на 19,6 % ($p < 0,05$). Активність CAT суттєво зростала у нормотензивних щурів з тенденцію перевищення контрольних значень, а у гіпертензивних збільшилась на 60,2 % ($p < 0,05$). При цьому відмічено тенденцію зростання рівня продукції дієнових кон`югатів на тлі високого рівня DT-діафорази.

Схожий фармакологічний ефект спостерігали щодо дії сульфату магнію. У нормотензивних щурів встановлено активацію SOD і CAT (на 19,7 % і 18,6 %, $p < 0,05$), а у гіпертензивних лише CAT (на 25,2 %, $p < 0,05$). Рівень дієнових кон`югатів перевищував контрольні значення майже в 2 рази, що вказує на прогресуючий перебіг ПОЛ при гіпоксії.

Суттєве відновлення метаболічних порушень встановлено у групі щурів, яким вводили корвітин – водорозчинну форму флавоноїду кверцетину. Встановлено відновлення активності SOD у нормо- і гіпертензивних щурів, CAT у нормотензивних щурів і тенденцію до нормалізації активності ензиму у щурів лінії із САГ (активність збільшилась в 2,6 разів, $p < 0,05$). Рівень MDA достовірно зменшився на 18,7 % і 20,5 %, а дієнових кон`югатів на 17,9 % у гіпертензивних щурів. При цьому змін активності DT-діафорази не реєстрували. Тобто, дія корвітина мала активуючий ефект на ензиматичні системи утилізації АФК та виражений антиоксидантний ефект на рівні прямої нейтралізації АФК, пригнічення ПОЛ та утворення цитотоксичних ліпідних похідних – малонового діальдегіду.

Зменшення метаболічних розладів при інсульті встановлено і при введенні діуретичного засобу торасеміду. Відновлення активності антиоксидантних ферментів встановлено у групі нормотензивних щурів, а у гіпертензивних – наближались до контрольних значень (збільшення активності на 30,2 % і в 2,5 разів, $p < 0,05$). При цьому відмічено тенденцію зменшення продукції MDA при інсульті у нормотензивних щурів і дієнових кон`югатів у гіпертензивних тварин, що свідчить про тенденцію зменшення ПОЛ.

Комбіноване введення досліджуваних засобів значно зменшило дисметаболічні розлади у щурів після геморагічного інсульту, що супроводжувалось активацією антиоксидантних ферментів, зменшенням продукції MDA і частковою нормалізацією мітохондріального дихання. Активність SOD і CAT відповідала показникам контрольної групи щурів, а у нормотензивних щурів відмічено компенсаторне збільшення CAT, активність DT-діафорази нормалізувалась лише у нормотензивних тварин, рівень MDA зменшився на 26,6 % і 21,4 % ($p < 0,05$) відповідно до дослідної групи, а утилізація дієнових кон`югатів – лише у лінії щурів із САГ (23,1 %, $p < 0,05$).

Таким чином, так звані петлеві діуретики тривалої дії (торасемід), що підвищують екскрецію іонів натрію товстими канальцями висхідного сегмента петлі Генле, мають виражений терапевтичний потенціал щодо відновлення ферментативних цитопротекторних систем мозку при інсульті та вазогенного і посттравматичного набряку мозку. За даними інших авторів [13,25] торасемід пригнічує набряк

нервових клітин при ацидозі, тому часткова дегідратація мозку шляхом індукції діурезу зменшує цитотоксичний набряк і дистрофічні зміни тканини мозку. Аналогічний вплив здійснював сульфат магнію, що має слабкий гіпотензивний і седативний ефекти. Вважається, що магній на різних етапах розвитку ішемічного ушкодження нервових клітин (ексайтотоксичності) вступає в антагонізм з іонами кальцію як на рівні мембранних каналів, так і цитоплазми клітини. Підвищений вміст внутрішньоклітинного магнію призводить до буферизації кальцію всередині мітохондрій, а також перешкоджає виснаженню клітинного пулу АТФ, що опосередковано здійснює нейропротекторний вплив [2,12,27].

Нейропротекторний вплив здійснюють також нейротрофічні пептиди і зокрема BDNF. Введення BDNF покращує функціональне відновлення, реміелінізацію та відновлення нейронних зв'язків при інсульті [15,23], а на метаболічному рівні обмежується активацією каталази і супероксиддисмутази, не пригнічуючи ПОЛ, тобто має слабко виражену дію щодо досліджуваних показників.

На відміну від проаналізованих засобів корвітин активує системи детоксикації і пригнічує ПОЛ та утворення цитотоксичних похідних – малонового діальдегіду і дієнових кон'югатів. Окислювальний стрес є однією із ключових ланок у патогенезі церебральної ішемії і флавоноїди, утилізуючи АФК, здійснюють нейропротекторну дію при інсульті [14,24]. При цьому можна стверджувати, що в запропонованій комбінованій схемі утилізація малонового діальдегіду реалізується саме прямою акцепцією електронів (АФК) кверцетином. Тому такий системний підхід дозволив вплинути на різні патогенетичні мішені ішемічного ураження нервових клітин, в тому числі – на відновлення метаболізму мітохондріальних хінонів.

Висновки.

1. В корі великого мозку щурів із геморагічним інсультом встановлено зниження активності ферментів антиоксидантних захисних механізмів (супероксиддисмутази і каталізи) і утворення продуктів перекисного окиснення ліпідів (малонового діальдегіду, дієнових кон'югатів).

2. Моделювання геморагічного інсульту супроводжувалось прогресуючими дисметаболічними порушеннями кори мозку із меншим потенціалом до фармакологічної корекції на тлі артеріальної гіпертензії.

3. Стимулюючий вплив на ферменти антиоксидантного профілю здійснювали торасемід, сульфат магнію, кверцетин і BDNF, а на утворення малонового діальдегіду і дієнових кон'югатів – корвітин.

4. Комбіноване введення торасеміду, сульфату магнію, кверцетину і BDNF відновлювало показники антиоксидантного профілю кори великого мозку щурів із геморагічний інсультом і пригнічувало утворення продуктів перекисного окиснення ліпідів.

Перспективи подальших досліджень. Планується дослідити морфологічні зміни кори великого мозку для співставлення із біохімічними даними та аналізу фармакологічної дії досліджуваних лікарських засобів.

Література

1. Aebi H. Catalase in vitro / H. Aebi // Meth. Enzymol. – 1984. – Vol. 105. – P. 121-126.
2. Afshari D. Evaluation of the intravenous magnesium sulfate effect in clinical improvement of patients with acute ischemic stroke / D. Afshari, N. Moradian, M. Rezaei // Clin. Neurol. Neurosurg. – 2013. – Vol. 115 (4). – P. 400-404.
3. Cao S. A novel mechanism for cytoprotection against hypoxic injury: δ-opioid receptor-mediated increase in Nrf2 translocation / S. Cao, D. Chao, H. Zhou [et al.] / Br. J. Pharmacol. – 2014 [Epub ahead of print].
4. Dontsov V. I. Reactive oxygen species as a system: significance in physiology, pathology and natural ageing / V. I. Dontsov, V. N. Krut'ko, B. M. Mrikaev [et al.] // Proceedings SAI RAS. – 2006. – Vol. 19. – P. 50-69.
5. Gang G. T. Protection of NAD(P)H :quinone oxidoreductase 1 against renal ischemia/reperfusion injury in mice / G. T. Gang, J. H. Hwang, Y. H. Kim [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2014. – Vol. 67. – P. 139-149.
6. Hanson L. R. Cerebrolysin reduces infarct volume and improves behaviour in a rat model of acute stroke / L. R. Hanson, X. F. Liu, P. M. Martinez [et al.] // International Journal of Stroke. – 2008. – Vol. 3 (1). – P. 168.
7. Janero D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury / D. R. Janero // Free Rad. Biol. Med. – 1990. – Vol. 9 (6). – P. 515-540.
8. Kakkar V. Curcumin loaded solid lipid nanoparticles : An efficient formulation approach for cerebral ischemic reperfusion injury in rats / V. Kakkar, S. Muppu, K. Chopra [et al.] // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2013. – Vol. 85 (3). – P. 339–345.
9. Kapinya K. J. Role of NAD(P)H :quinone oxidoreductase in the progression of neuronal cell death in vitro and following cerebral ischaemia in vivo / K. J. Kapinya, U. Harms, C. Harms [et al.] // J. Neurochem. – 2003. – Vol. 84 (5). – P. 1028-1039.
10. Kazimirko V. K. Free-Radical Oxidation and the Antioxidant Therapy / V. K. Kazimirko, V. I. Maltsev, V. Y. Butylkin, N. I. Gorobets. – K. : Morion, 2004. – 160 p. (In Russian).
11. Kargin V. I. Interactions of positively charged ubiquinone analogue (MitoQ(10)) with DT-diaphorase in liver mitochondria / V. I. Kargin, K. A. Motovilov, A. Yu. Vyssokikh [et al.] // Biol. Membr. – 2008. – Vol. 25. – P. 34–40.
12. Kuzenkov V. S. The effect of magnesium nitrate on the outcome of experimental acute ischemic stroke / V. S. Kuzenkov, A. L. Krushinskiĭ // Zh. Nevrol. Psikhiatr. Im. S. S. Korsakova. – 2014. – Vol. 114 (3). – P. 27-31.
13. Le Bars E. Delayed progression of cytotoxic oedema in focal cerebral ischemia after treatment with a torasemide derivative : a diffusion-weighted magnetic resonance imaging study / E. Le Bars, S. Roussel, C. Rймy [et al.] // Neurosci Lett. – 1996. – Vol. 213 (2). – P. 123-126.
14. Lee J. K. Quercetin reduces the elevated matrix metalloproteinases-9 level and improves functional outcome after cerebral focal ischemia in rats / J. K. Lee, H. J. Kwak, M. S. Piao [et al.] // Acta Neurochir (Wien). – 2011. – Vol. 153 (6). – P. 1321-1329.

15. Li J. Serum Brain-derived neurotrophic factor levels in post-stroke depression / J. Li, Y. D. Zhao, J. W. Zeng [et al.] // J. Affect Disord. – 2014. – Vol. 168. – P. 373-379.
16. Lin C. Y. The impact of comorbidity on survival after hemorrhagic stroke among dialysis patients: a nationwide population-based study / C. Y. Lin, C. C. Chien, H. A. Chen [et al.] // BMC Nephrol. – 2014. – Vol. 27 (15). – P. 186.
17. Lind C. DT-diaphorase : purification, properties, and function / C. Lind, E. Cadenas, P. Hochstein [et al.] // Methods Enzymol. – 1990. – Vol. 186. – P. 287–301.
18. Lowry O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent Lowry / O. H. Lowry, R. J. Rosebrought, A. Farr [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193 (1). – P. 265-275.
19. Makarenko A. N. The method of modeling the local hemorrhage in different structures of the brain in experimental animals / A. N. Makarenko, N. S. Kosytsin, N. V. Pasykova [et al.] // J. Higher Nervous Activity. – 2002. – Vol. 52 (6). – P. 765-768.
20. Mirsa H. P. The role of super oxide anion in the antioxidation of epinefrine and simple assay for superoxide dismutase / H. P. Mirsa, Y. Fredovich // IAMA. – 1972. – Vol. 247(10). – P. 3170-3175.
21. Paxinos G. The rat brain in stereotaxic coordinats / G. Paxinos, C. Watson. – Sydney: Academic Press, 1982. – 1480 p.
22. Petrova G. V. Cytotoxicity of troglitazone, a structural analogue of α-tocopherol is mediated by inhibition of NAD(P)H : Quinone oxidoreductase / G. V. Petrova, G. V. Donchenko // Ukr. Biochem. J. – 2009. – 81, № 4. – P. 82-88.
23. Ramos-Cejudo J. Brain-derived neurotrophic factor administration mediated oligodendrocyte differentiation and myelin formation in subcortical ischemic stroke / J. Ramos-Cejudo, M. Gutiйrrez-Fernбndez, L. Otero-Ortega [et al.] // Stroke. – 2015. – Vol. 46 (1). – P. 221-228.
24. Rivera F. Reduction of ischemic brain damage and increase of glutathione by a liposomal preparation of quercetin in permanent focal ischemia in rats / F. Rivera, G. Costa, A. Abin [et al.] // Neurotox Res. – 2008. – Vol. 13 (2). – P. 105-114.
25. Staub F. Treatment of vasogenic brain edema with the novel Cl- transport inhibitor torasemide / F. Staub, M. Stoffel, S. Berger [et al.] // J. Neurotrauma. – 1994. – Vol. 11 (6). – P. 679-690.
26. Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Uchiyama, M. Mihara. // Anal. Biochem. – 1978. – Vol. 86 (1). – P. 271-278.
27. Wang L. C. Magnesium sulfate and nimesulide have synergistic effects on rescuing brain damage after transient focal ischemia / L. C. Wang, C. Y. Huang, H. K. Wang [et al.] // J. Neurotrauma. – 2012. – Vol. 29 (7). – P. 1518-1529.
28. Watanabe N. Quinones and glutathione metabolism / N. Watanabe, D. Dicknson, R. Liu [et al.] // Meth. Enzymology. – 2004. – Vol. 378. – P. 319-340.

УДК 612. 824. 4:577. 325. 6

МЕТАБОЛІЧНІ ЗМІНИ КОРИ ВЕЛИКОГО МОЗКУ ЩУРІВ ПІСЛЯ МОДЕЛЮВАННЯ ГЕМОРАГІЧНОГО ІНСУЛЬТУ

Олійник Т. М., Савосько С. І., Чайковський Ю. Б.

Резюме. В статті наведено аналіз метаболічних змін кори великого мозку щурів після моделювання геморагічного інсульту та впливу лікарських засобів на відновлення активності ферментів та пригнічення утворення цитотоксичних метаболітів. Встановлено, що моделювання інсульту у щурів із спонтанною артеріальною гіпертензією погіршує дисметаболічні розлади на рівні антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази і каталази), мітохондріальної дисфункції (DT-діафорази) і продуктів перекисного окиснення (малоновий діальдегід, дієнові кон'югати). Введенні щурам BDNF, $MgSO_4$, корвітину або торасеміду характеризувалось збільшенням активності супероксиддисмутази і каталази, а пригнічення утворення ТБК-активних продуктів лише у групі із корвітином. Комбіноване введення досліджуваних засобів суттєво пригнічувало продукцію малонового діальдегіду і дієнових кон'югатів, відновлювало активність ферментів антиоксидантного профілю дії, а нормалізацію активності DT-діафорази встановлено лише у нормотензивних щурів із інсультом. Отримані дані дозволяють стверджувати, що артеріальна гіпертензія є не лише етіологічним фактором геморагічного інсульту, а і чинником, що визначає прогресування цитотоксичних метаболічних розладів.

Ключові слова: геморагічний інсульт, артеріальна гіпертензія, ферменти, метаболізм, фармакокорекція.

УДК 612. 824. 4: 577. 325. 6

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОРЫ БОЛЬШОГО МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ ГЕМОРРАГИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Олейник Т. Н., Савосько С. И., Чайковский Ю. Б.

Резюме. В статье приведен анализ метаболических изменений коры большого мозга крыс после моделирования геморрагического инсульта и влияния лекарственных средств на восстановление активности ферментов и угнетение образования цитотоксических метаболитов. Установлено, что моделирование инсульта у крыс со спонтанной артериальной гипертензией ухудшает дисметаболические расстройства на уровне антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы и каталазы), митохондриальной дисфункции (DT-диафоразы) и продуктов перекисного окисления (малоновый диальдегид, диеновие конъюгаты). Введение крысам BDNF, $MgSO_4$, корвитина или торасемида характеризовалось увеличением активности супероксиддисмутазы и каталазы, а угнетение образования ТБК-активных продуктов только группе с корвитином. Комбинированное введение исследуемых средств существенно подавляло продукцию малонового диальдегида и диеновых конъюгатов, восстанавливало активность ферментов антиоксидантной профиля действия, а нормализацию активности DT-диафоразы установлено только у нормотензивных крыс с

инсультом. Полученные данные позволяют утверждать, что артериальная гипертензия является не только этиологическим фактором геморрагического инсульта, а и фактором, определяющим прогрессирование цитотоксических метаболических расстройств.

Ключевые слова: геморрагический инсульт, артериальная гипертензия, ферменты, метаболизм, фармакокоррекция.

UDC 612. 824. 4: 577. 325. 6

Metabolic Changes in the Cerebral Cortex after Hemorrhagic Stroke Simulation in Rats

Oliinyk T. M., Savosko S. I., Chaikovsky Y. B.

Abstract. In this study presented results of metabolic disorders after hemorrhagic stroke, role of arterial hypertension in these disorders and the ability to influence the activity of enzyme systems through the application of neurotrophic (BDNF), antihypertension (magnesium sulfate), diuretic (torasemide) and antioxidant (quercetin) medications.

The experimental study was conducted on 120 male rats. Hemorrhagic stroke modeled by mechanical destruction of internal capsule (capsula interna dextra, L = 3,5-4,0; H = 6,0; AP = 0,6-1,0) and blood injection (0,15-0,2 ml).

After modeling hemorrhagic stroke intraperitoneally injected drugs in normotensive rats (WKY) and rats with spontaneous hypertension: BDNF (20 mg/rat or 80 mg/kg after 2 hours and 3 days after stroke), $MgSO_4$ (10 ml/day or 0,15 ml/kg), quercetin (500 mg/day or 7,2 mg/kg), torasemide (10 mg/day or 0,15 mg/kg) – after 2 hours after stroke and next 5 days once per day.

In 10 days after stroke determined the activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), NAD(P)H-quinone oxidoreductase, the concentration of malondialdehyde (MDA) and diene conjugates (DC).

The results of experimental studies have shown that in rats with hemorrhagic stroke at 25,9 % ($p < 0,05$) increases the activity of NAD(P)H-quinone oxidoreductase; in hypertensive rats significantly difference from the control group is not set (output activity of NAD(P)H-quinone oxidoreductase in hypertensive rats on 64,1 % higher compared to normotensive, $p < 0,05$).

The level of MDA in homogenate of cerebral cortex of rats with stroke was higher in 2,2 and 1,9 times ($p < 0,01$), DC – 1,5 and 1,9 times ($p < 0,01$) respectively normotensive and hypertensive rats. The level of MDA production in hypertensive rats was higher on 67,1 % compared to normotensive rats.

SOD and CAT activity after stroke decreased on 10,9 % and 16,2 % ($p < 0,05$) in normotensive rats and 32,7 % and 69,4 % ($p < 0,05$) in hypertensive rats. That is, at hemorrhagic stroke on arterial hypertension are more violated antioxidant system, and increased catalase activity in hypertensive rats is a compensatory mechanism for utilization of hydrogen peroxide, which generated during mitochondrial dysfunction in high blood pressure.

Application of BDNF, torasemide and magnesium sulfate increased activity of SOD and CAT, but had no effect on MDA and DC production. Quercetin restored SOD activity in normo- and hypertensive rats, CAT in normotensive rats and tends to normalize the activity of the enzyme in hypertensive rats (activity increased in 2,6 times, $p < 0,05$). The MDA level was significantly decreased by 18,7 % and 20,5 %, and DC on 17,9 % in hypertensive rats.

The combination of medications significantly reduced metabolic disorders after hemorrhagic stroke: antioxidant enzymes activation, reduced of MDA production and partial normalization of mitochondrial respiration. NAD(P) H-quinone oxidoreductase activity normalized only in normotensive rats, MDA level decreased by 26,6 % and 21,4 % ($p < 0,05$) according to the experimental group and recycling DC – only in hypertensive rats (by 23,1 %, $p < 0,05$).

Arguably, the antihypertensive drug (magnesium sulfate), diuretics (torasemide) and neurotrophic factor (BDNF) reduce degenerative processes after stroke, accompanied by compensatory activation of antioxidant enzymes; bioflavonoid quercetin, in addition to these actions, inhibits lipid peroxidation and significantly restores brain metabolism.

Keywords: hemorrhagic stroke, arterial hypertension, enzymes, metabolic, pharmacological correction.

Рецензент – проф. Непорада К. С.

Стаття надійшла 26. 02. 2015 р.