

## Summary

DYNAMICS OF NEUROLOGICAL DEFICIT IN RATS EXPERIENCED MODELLED ISCHEMIC STROKE WITH ANTITHROMBOTIC AND ANTICOAGULANT PHARMACOLOGICAL CORRECTION

Melnyk V.S., Savosko S.I.

Key words: ischemic stroke, nadroparin calcium, aspirin, neurological deficit, experiment.

This study was aimed to assess regression of functional disorders in rats experienced ischemic stroke against the background of aspirin and fraxiparin therapy to prevent secondary cerebral lesions, stroke recurrence. Nadroparin calcium in combination with aspirin provided a regression of neurological deficit on the 14<sup>th</sup> day since local ischemic stroke had been modelled, but at the same time among the experimental animals an increase in mortality in the acute period (1-5 days) against nadroparin calcium administered was observed.

УДК 616.5-001.2-092.9:577.121:546.172.6

**Миронченко С. И., Звягинцева Т. В.**

## МЕТАБОЛИТЫ ОКСИДА АЗОТА ПРИ УЛЬТРАФИОЛЕТ-ИНДУЦИРОВАННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ КОЖИ МОРСКИХ СВИНОК

Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, Украина

*Избыточное количество оксида азота (NO) приводит к нарушениям иммунологического характера, которые играют первостепенную роль в развитии не только ранних, но и отдаленных последствий УФ-излучения. Цель: изучение метаболитов NO и активности индуцибельной NO-синтазы в крови морских свинок в эритемные сроки локального ультрафиолетового облучения (УФО) кожи. Материалы и методы. Исследования были выполнены на 18 морских свинках-альбиносах. Эритему вызывали облучением выбритого участка кожи УФ-лучами с помощью ртутно-кварцевого облучателя. Через 4 часа и на 3-и сутки в сыворотке крови определяли содержание общих метаболитов NO, нитрит-аниона, нитратов, активность индуцибельной NO-синтазы (iNOS). Группой контроля служили интактные морские свинки. Результаты. При местном УФО кожи у морских свинок наблюдается выраженная эритема, сопровождающаяся повышением в крови концентрации всех метаболитов оксида азота (суммарных, нитрит-аниона, нитратов) и активности индуцибельной NO-синтазы. Резкое повышение активности iNOS, приводящее к накоплению метаболитов NO в крови, свидетельствуют о серьезных иммунологических сдвигах, возникающих под влиянием локального УФО кожи. Выводы. 1. Локальное ультрафиолетовое облучение кожи морских свинок вызывает повышение в крови концентрации всех метаболитов оксида азота в течение 3 суток. 2. Параллельно накоплению метаболитов NO в крови возрастает активность индуцибельной синтазы (iNOS) в течение 3 суток.*

Ключевые слова: метаболиты оксида азота, ультрафиолетовое облучение кожи

*Связь публикации с плановыми научно-исследовательскими работами – работа выполнена соответственно плану научно-исследовательской работы Харьковского национального медицинского университета «Механизмы и фармакологическая коррекция ультрафиолет-индуцированных повреждений кожи» (№ державної реєстрації 0113U002281).*

Кроме положительных эффектов (обеспечение метаболизма веществ, способствующих образованию витамина Д, улучшение самочувствия, устранение депрессивных состояний), избыток солнечного облучения оказывает негативное влияние [1]. К быстрым проявлениям поражения кожи чрезмерным количеством ультрафиолетовыми (УФ)-лучами относятся эритема, солнечные ожоги, телеангиоэктазии [1]. Одним из эффектов, инициируемых избыточным уровнем УФ излучения, является развитие процессов, приводящих к оксидативному стрессу [2]. Свободные радикалы, образующиеся после УФ облучения, запускают синтез оксида азота (NO) – уникального медиатора межклеточного взаимодействия, имеющего разнонаправленное действие [2,3]. Помимо регуляторного и защитного NO оказывает и повреждающее действие, реализуемое путем ингибирования активности ферментов, нарушения структуры ДНК, индукции процессов перекисного окисления липидов,

снижения антиоксидантного потенциала и др. [3,4]. Регуляторное и защитное действие NO осуществляется за счет стабильных его концентраций. Синтез малых, необходимых для нормальной жизнедеятельности организма количеств NO, происходит под влиянием конститутивной NO-синтазы (cNOS). Повреждающее действие NO осуществляется чрезмерными концентрациями. Синтез высоких концентраций связан с активностью индуцибельной NO-синтазы (i-NOS), локализованной в лейкоцитах. Индуцибельная NO-синтаза экспрессируется под воздействием бактериальных продуктов, провоспалительных цитокинов и активных форм кислорода, обеспечивая синтез большого количества NO, способного оказывать токсическое, повреждающее действие на клетку [4,5]. Избыточное количество NO приводит к нарушениям иммунологического характера, которые, как известно, играют первостепенную роль в развитии не только ранних, но и отдаленных последствий

УФ-излучения: фотостарение, канцерогенез и т.д. [1,6,7].

**Цель**

Изучение метаболитов NO и активности индуцибельной NO-синтазы в крови морских свинок в эритемные сроки локального ультрафиолетового облучения кожи.

**Материалы и методы**

Исследования были выполнены на 18 морских свинках-альбиносах. Эритему вызывали облучением выбритого участка кожи УФ-лучами с помощью ртутно-кварцевого облучателя (ОКН-11-М), помещенного на расстоянии 10 см от животного, в течение 2 минут. При этом участок кожи экранировался круглой пластинкой, имеющей пять отверстий диаметром 6 мм. Степень реакции оценивали через 1, 2, 4 часа и 3 суток после облучения в баллах для каждого пятна: 0 – отсутствие эритемы, 1 – четкое покраснение, 2 – интенсивная эритема. Суммировали интенсивность 5-и пятен. Уровень повреждающего действия оценивали по интенсивности и длительности эритемной реакции [8]. Через 4 часа и на 3-и сутки в сыворотке крови определяли содержание общих метаболитов NO, нитрит-аниона, нитратов спектрофотометрическим методом [9], активность индуцибельной NO-синтазы – методом оптического анализа [10]. Группой контроля служили интактные морские свинки (6). Эксперименты на животных проведены в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, использующихся в экспериментальных и других

научных целях, законом Украины «О защите животных от жестокого отношения».

Результаты исследований обрабатывали стандартными методами вариационной статистики [11].

**Результаты исследования и их обсуждение**

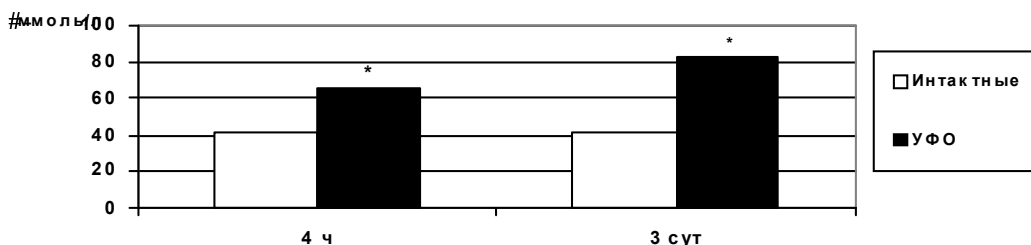
Динамика эритемной реакции представлена в табл. 1.

Таблица 1  
Суммарная интенсивность в баллах эритемной реакции кожи морских свинок, подвергшихся локальному УФ-облучению

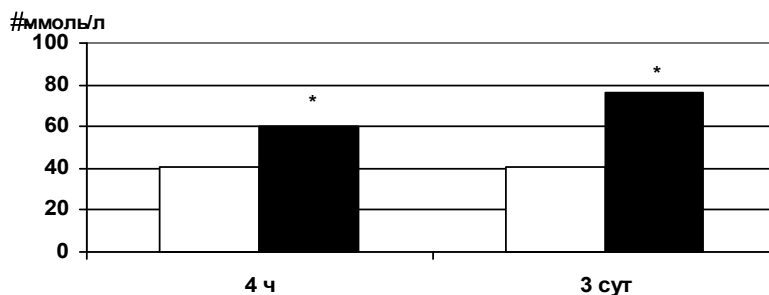
Группа животных	Время после облучения			
	1 час	2 часа	4 часа	3 суток
УФО	3,5 (2-5)	4,8 (4-6)	9,2 (8-10)	7,7 (7-8)

У всех морских свинок после локального ультрафиолетового облучения (УФО) развивалась эритема. Через 1 час после облучения суммарная эритема составляла 3,5 балла, через 2 часа – 4,8 балла. Через 4 часа после облучения регистрировался максимум, когда суммарная интенсивность 5-и пятен возрастала до 9,2 балла. На 3-и сутки интенсивность суммарной эритемы была выраженной, составляя 7,7 баллов.

Исследования содержания метаболитов NO в крови морских свинок показало, что через 4 часа после облучения содержание всех метаболитов значительно превышало показатели у интактных морских свинок: суммарные метаболиты – в 1,6 раза (рис. 1,а), нитраты – в 1,5 раза (рис. 1,б), нитрит-анион – в 2,6 раза (рис. 1,в).



а)



б)

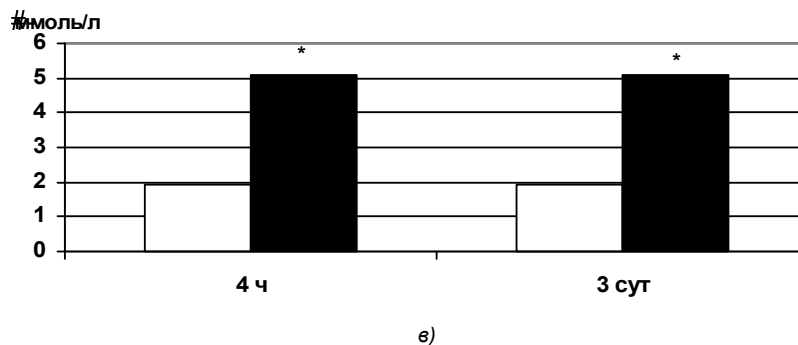


Рис. 1. Содержание суммарных метаболитов NO (а), нитратов (б), нитрит-аниона (в) в крови морских свинок при УФО  
\*-достоверно относительно интактных морских свинок ( $p < 0,05$ )

На 3-и сутки уровень метаболитов NO оставался по-прежнему высоким: суммарных метаболитов превышал норму в 2 раза (рис. 1,а), нитратов – в 1,9 раза (рис. 1,б), нитрит-аниона – в 2,6 раза (рис. 1,в).

Активность iNOS через 4 часа после облучения увеличивалась в 2,1 раза, на 3-и сутки – в 3,1 раза по сравнению с интактными животными (рис. 2).

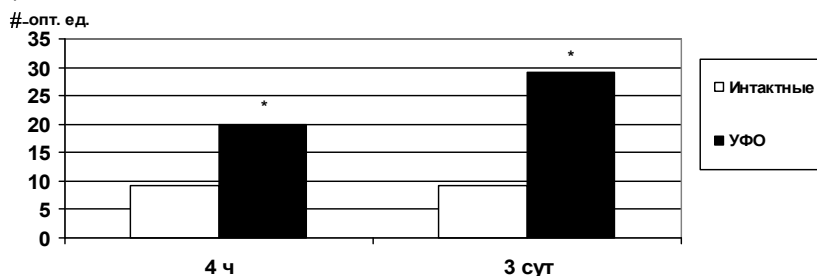


Рис. 2. Активность индуцибельной синтазы в крови морских свинок при УФО

\*-достоверно относительно интактных морских свинок ( $p < 0,05$ )

Следовательно, даже однократное ультрафиолетовое облучение кожи вызывает интенсификацию синтеза NO, что подтверждается увеличением всех его метаболитов в крови. Особое внимание обращают чрезмерно высокие концентрации наиболее токсичного метаболита – нитрит-аниона. Параллельно накоплению метаболитов NO в крови возрастает активность индуцибельной синтазы. В норме iNOS, как известно, не синтезируется, но под влиянием супероксида и цитокинов происходит сверхэкспрессия iNOS и синтез NO в количествах на несколько порядков выше, чем при работе cNOS [2,3]. Поэтому избыточный уровень нитрит-аниона и нитратов свидетельствует о высокой интенсивности синтеза NO ферментом iNOS. Резкое повышение активности iNOS, приводящее к накоплению метаболитов NO в крови, свидетельствуют о серьезных иммунологических сдвигах, возникающих под влиянием локального УФО кожи.

Таким образом, при местном ультрафиолетовом облучении кожи у морских свинок наблюдается выраженная эритема, сопровождающаяся иммунными нарушениями, что подтверждается повышением в крови концентрации всех метаболитов оксида азота (суммарных, нитрит-аниона, нитратов) и активности индуцибельной синтазы.

Это диктует необходимость лечебно-

профилактических мероприятий, уменьшающих не только выраженность эритемной реакции, но и предотвращающих иммунологические нарушения в организме, который подвергся УФО. Фармакологическая коррекция иммунных нарушений, возникших под влиянием УФО, составит цель наших дальнейших исследований.

### Выводы

1. Локальное ультрафиолетовое облучение кожи морских свинок вызывает повышение в крови концентрации всех метаболитов оксида азота (суммарных, нитрит-аниона, нитратов) в течение 3 суток.

2. Параллельно накоплению метаболитов NO в крови возрастает активность индуцибельной синтазы (iNOS) в течение 3 суток.

### Литература

1. Калюжна Л.Д. Фотодерматозы: клініка, діагностика, профілактика з використанням сучасних фотозахисних засобів. (методичні рекомендації) // Л.Д. Калюжна, Е.О. Мурзіна, К.О.Бардова. – Київ, 2011. – 44 с.
2. Верещака В.В. Окисний стрес у шкірі щурів при патологічних станах, зумовлених дією ультрафіолетового опромінення / В.В. Верещака, С.А. Олійник // Журнал Академії Медичних Наук України. – 2007. – Т. 13, № 4. – С. 795-806.
3. Чеснокова Н.П. Источники образования свободных радикалов и их значение в биологических системах в условиях нормы / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова // Современные наукоемкие технологии. – 2006. – № 6 – С. 28–34
4. Меньщикова Е.Б. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, В.П. Реутов // Биохимия. – 2000. – Т. 65, Вып. 4. – С. 485–503.

- Zamora R. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases / R. Zamora, V. Vodovotz, T.R. Billiar // *Molec. Med.* – 2000. – Vol. 6, № 5. – P. 347–373.
- Ullrich S. Mechanisms underlying UV-induced immune suppression: implications for sunscreen design / S. Ullrich, M. Kripke, H. Ananthaswamy [et al.] // *Exp. Dermatol.* – 2002 – Vol. 11, № 1. – P. 13–17.
- Черний В.И. Нарушения иммунитета при критических состояниях. Особенности диагностики / В.И. Черний, А.Н. Нестеренко // *Внутрішня медицина.* – 2007. – № 2. – С. 25–35.
- Стефанов А.В. Биоскрининг. Лекарственные средства / Стефанов А.В. – К. : Авиценна, 1998. – 189 с.
- Метельская В. А. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота / В.А. Метельская, Н.Г. Гуманова // *Клин. лаб. диагностика.* – 2005. – № 6. – С 15–18.
- Головчак Х.М. Вплив ентеросорбентів на активність NO-синтази у клітинах щурів за умов введення афлатоксину В1 / Х.М. Головчак, І. В. Панчук, Г.Л. Антоняк, О.С. Возна // *Біологія тварин.* – 2014. – Т. 16, № 1. – С. 55–62.
- Гланц С. Медико-биологическая статистика / Гланц С. – М. : Практика, 1998. – 459 с.

### Реферат

#### МЕТАБОЛІТИ ОКСИДУ АЗОТУ ПРИ УЛЬТРАФІОЛЕТ-ІНДУКОВАНИХ УШКОДЖЕННЯХ ШКИРИ МОРСЬКИХ СВИНОК

Миронченко С. І., Звягінцева Т. В.

Ключові слова: метаболіти оксиду азоту, ультрафіолетове опромінення шкіри

Надлишкова кількість оксиду азоту NO призводить до порушень імунологічного характеру, які грають первинну роль у розвитку не лише ранніх, але і віддалених наслідків ультрафіолетового (УФ)-випромінювання. Мета: вивчення метаболітів NO і активності індукцибельної NO-синтази в крові морських свинок в еритемний період локального ультрафіолетового опромінення (УФО) шкіри. Матеріали і методи. Дослідження були виконані на 18 морських свинках-альбіносах. Еритему викликали опроміненням поголеної ділянки шкіри УФ-променями за допомогою ртутно-кварцового опромінювача. Через 4 години та на 3-ю доба в сироватці крові визначали вміст загальних метаболітів NO, нітрит-аніону, нітратів, активність індукцибельної NO-синтази (iNOS). Групою контролю служили інтактні морські свинки. Результати. При місцевому УФО шкіри у морських свинок спостерігається виражена еритема, що супроводжується підвищенням в крові концентрації всіх метаболітів оксиду азоту (сумарних, нітрит-аніону, нітратів) й активності індукцибельної NO-синтази. Різка підвищення активності iNOS, що призводить до накопичення метаболітів NO в крові, свідчить про серйозні імунологічні зрушення, що виникають під впливом локального ультрафіолетового опромінення шкіри. Висновки. 1. Локальне ультрафіолетове опромінення шкіри морських свинок викликає підвищення в крові концентрації всіх метаболітів оксиду азоту протягом 3 діб. 2. Паралельно накопиченню метаболітів NO в крові зростає активність індукцибельної NO-синтази протягом 3 діб.

### Summary

#### NITRIC OXIDE METABOLITES IN ULTRAVIOLET-INDUCED SKIN DAMAGES OF GUINEA PIGS

Mironchenko S.I., Zvyagintseva T. V.

Key words: nitric oxide metabolites, ultraviolet irradiation, skin.

Excessive amount of nitric oxide (NO) results in immunological disorders, which play a leading role in the development of not only early, but also long-term effects caused by exposure to UV radiation. Objective: to study the NO metabolites and inducible NO-synthase activity in the blood of guinea pigs during erythema exposure periods of local ultraviolet irradiation (UVR) of the skin. Materials and methods. Studies were performed on 18 albino guinea pigs. Erythema was induced by exposure of shaved skin area to UV rays produced by a mercury-quartz illuminator. Total NO metabolites, nitrite anions, nitrates, inducible NO-synthase (iNOS) activity in the blood serum were studied in 4 hours and on the 3<sup>rd</sup> day after the exposure. The control group involved intact guinea pigs. Results. Under the exposure to local UV irradiation the skin of guinea pigs was observed to be pronounced erythematic, accompanied by an increase in the blood concentration of all NO metabolites (total nitrite anion, nitrate) and the activity of inducible NO-synthase. Sharp increase in iNOS activity leading to the accumulation of NO metabolites in the blood shows significant immunological changes that occur due to the influence of the local exposure of the skin to UV irradiation. Conclusions. 1. Local exposure of the skin of guinea pigs to UV irradiation causes a rise in the blood concentration of nitric oxide for 3 days. 2. Accumulation of NO metabolites in the blood increases parallel to the growth in the inducible nitric (iNOS) activity.