

указывает на протективную роль аргиназы в механизме метакрилат-зависимой дисфункции слюнных желез.

Summary

ROLE OF ARGINASE IN THE MECHANISMS OF IMPAIRMENT OF FREE RADICAL PROCESSES AND SALIVARY GLAND FUNCTIONING IN RATS UNDER METHACRYLIC ACID METHYL ESTER APPLICATION

Nagornjak I.V., Kostenko V.A.

Key words: methacrylic acid methyl ester, arginase, L-norvaline, NO-synthase, superoxide anion radical, lipid peroxidation, salivary gland.

This research was aimed to study the effect of nonselective arginase inhibitor L-norvaline on the state of free radical processes and protein-synthesizing function of submandibular salivary glands in 30 white rats for 30-day applications of 1% solution of methacrylic acid methyl ester onto the oral mucosa. It has been found out the L-norvaline administration (every other day during the experiment, in a dose of 10 mg/kg) is accompanied by reciprocal increase in total activity of NO-synthase and nitrite ions concentration, by the impairment of protein synthesizing function in submandibular salivary glands, by overproduction of superoxide anion radical in the tissues by NADH-dependent (mitochondrial) electron transport chain, by the activation of lipid peroxidation, inhibition of superoxide dismutase and catalase that indicates the protective role of arginase in the mechanism of methacrylate-dependent dysfunction of salivary glands.

Higher State Educational Institution of Ukraine

"Ukrainian Medical Stomatological Academy", Ukraine, Poltava

УДК 612.017.1:616.831-005

**Николаенко Т.В., Гарманчук Л.В., Макаренко А.Н., Сараева И.В.,
Петрук Н.А., Джус Е.И., Никулина В.В., Ступак Ю.А.**

КОРРЕКЦИЯ УРОВНЯ БИЛИРУБИНА И ГЛЮКОЗЫ АНТИИНСУЛЬТНЫМИ СРЕДСТВАМИ КАК МЕХАНИЗМ НОРМАЛИЗАЦИИ СОСУДИСТОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ГЕМОРАГИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ

Учебно-научный центр "Институт биологии" Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, г. Киев

Выявлено позитивное корректирующее влияние антиинсульных препаратов кортексина ("Герофарм", Россия), церебролизина ("Ebewe", Австрия), церебрала (новое средство — трофинотропин, Россия) на уровень биохимических показателей в сыворотке крови крыс с индуцированным геморрагическим инсультом. Было зафиксировано двукратное снижение общего билирубина у животных с индуцированным ГИ относительно группы интактных животных, в то время как препараты нормализуют этот показатель (наиболее эффективным был кортексин). Также показано, что кортексин и церебролизин увеличивали уровень глюкозы в сыворотке крови в 2 раза, тогда как церебрал лишь в 1,2 раза в сравнении с группой без терапии.

Ключевые слова: билирубин, глюкоза, сосудистая дисфункция, геморрагический инсульт.

Острый геморрагический инсульт является второй основной причиной смертности населения экономически развитых стран и варьирует в пределах от 38% до 80% [1]. На ранних этапах развития геморрагического инсульта в кровь выделяется большое количество билирубина, который является маркером окислительного стресса [2]. Повышение билирубина провоцирует выделение окислителей, вызывающих образование значительного количества продуктов окисления билирубина [3]. Поэтому билирубин в настоящее время признан в качестве важного антиоксиданта, эндогенного защитного фактора, обладающего противовоспалительным и нейропротекторными свойствами [4, 5]. При экспериментальном атеросклерозе билирубин тормозит

развитие заболевания, предотвращая образование артериальных тромбозов, а также тормозит развитие атеросклеротических бляшек в стенках сонных артерий [6, 7]. Кроме того, на животных моделях показано, что сверхэкспрессия гемоксигеназы-1 (HO-1) ингибирует образование атеросклеротических бляшек, а также исследовано влияние HO-1 на продукцию провоспалительных цитокинов, экспрессию эндотелиальной синтазы (eNOS) и эндотелий-зависимой релаксации сосудов. Эти результаты позволяют предположить, что антиатерогенные свойства HO-1 могут быть опосредованы преимущественно через действие билирубина путем ингибирования активации эндотелия сосудов и дисфункции в ответ на провоспалительный стресс

[8].

Кроме того, одним из важных факторов риска развития инсульта является сахарный диабет 2 типа, наличие которого повышает риск развития инсульта в 4 и более раз, приводит к прогрессии цереброваскулярной патологии в более раннем возрасте. Повышенный уровень глюкозы может способствовать изменению эндотелия сосудистой стенки и нарушению сосудистой проницаемости, что также оказывает влияние на течение заболевания [9]. Важнейшим звеном развития гемостатических изменений являются нарушения активности эндотелия сосудистой стенки. Эндотелий теряет способность к адекватному синтезу вазоконстрикторов и прокоагулянтов [10]. У больных СД, кроме того, имеется патология микроциркулярного русла, которая характеризуется нарушением функций эндотелия, увеличением проницаемости сосудов и выраженными гемореологическими сдвигами.

Основным результатом повреждения ткани мозга является воспалительный процесс в очаге ишемии через активацию провоспалительных цитокинов, которые опосредуют адгезию лейкоцитов к эндотелию сосудов, нарушение микроциркуляции и повреждение гематоэнцефалического барьера [11].

Учитывая важность клинических показателей уровня билирубина и глюкозы при геморрагическом инсульте, целью настоящего исследования состояла в определении уровня вышеуказанных маркеров при индуцированном инсульте в экспериментальных животных, а также оценке влияния разных линий терапии на течение и исход заболевания.

В эксперименте использовали крыс линии Вистар (самки, в возрасте 4 месяца с массой – 200 ± 20 г) разведения вивария Национального университета имени Тараса Шевченко. Все работы с животными проводили в соответствии с правилами биоэтического комитета по работе с экспериментальными животными [12]. Животных подвергали оперативному вмешательству с целью экспериментального воспроизведения геморрагического инсульта (ГИ) по разработанной ранее методике [13]. Для оценки терапевтического влияния на показатели билирубина и глюкозы при ГИ использовали серию препаратов с ноотропным механизмом действия – кортексин (“Герофарм”, Россия), церебролизин (“Ebewe”, Австрия), церебрал (новое средство — трофинотропин, Россия).

Определение билирубина и глюкозы в сыво-

ротке крови проводили на следующих группах животных (по 7 в каждой): интактные, ложноперирированные, животные с индуцированным ГИ, ГИ + плацебо, ГИ+ церебролизин, ГИ + кортексин, ГИ + церебрал. В качестве контроля, служили интактные и ложноперирированные животные. Препараты вводили ежедневно, 1 раз в сутки, в течение 7 дней, внутривентриально в объеме 2,5 мл (эквивалентную дозу каждого из препаратов рассчитывали в соответствии с рекомендациями фирм-изготовителей, на кг/г массы тела человека и коэффициентом пересчета ($K_p = 5,9$) от человека на крысу [5]), из расчета для кортексина — $1,8 \cdot 10^{-4}$ мг/г, церебролизина — $9,0 \cdot 10^{-3}$ мг/г, церебрала — $2,1 \cdot 10^{-4}$ мг/г массы тела животного. После декапитации животных под эфирным наркозом, отбирали кровь в стеклянные пробирки и после отстаивания в течение 1 часа при температуре 37°C , центрифугировали и отбирали сыворотку у каждого животного всех исследуемых групп.

Определение уровня билирубина проводили методом Эндрашика; глюкозы – глюкозооксидазным методом с использованием стандартного набора «Филисит-Диагностика» [14]. Полученные результаты обработаны статистически при помощи программы Microsoft Excel 7.0. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

В результате проведенных исследований было выявлено, что на 7 сутки уровень общего билирубина при развитии ГИ снижается в 1,5 раза в сравнение с контролем и ложноперирированной группой. При введении плацебо не наблюдалось никаких изменений, тогда как церебрал, церебролизин и кортексин нормализуют данные показатели и их значение практически не отличается от такого в контрольной группе. Церебролизин в терапевтическом диапазоне увеличивает концентрацию билирубина в крови в 1,9 ($p < 0,05$), церебрал – 1,7 ($p < 0,05$), кортексин – 2 раза ($p < 0,05$), соответственно, по сравнению с группой с индуцированным инсультом (рис.1А). Аналогичная тенденция наблюдается для прямого и непрямого билирубина при действии препаратов (рис.1Б) несмотря на то, что в группах животных с ГИ и ГИ+плацебо уменьшение общего билирубина было ассоциировано с существенным уменьшением непрямого билирубина. Это может свидетельствовать о том, что препараты проявляют позитивный терапевтический эффект и содействуют восстановлению организма после развития ГИ.

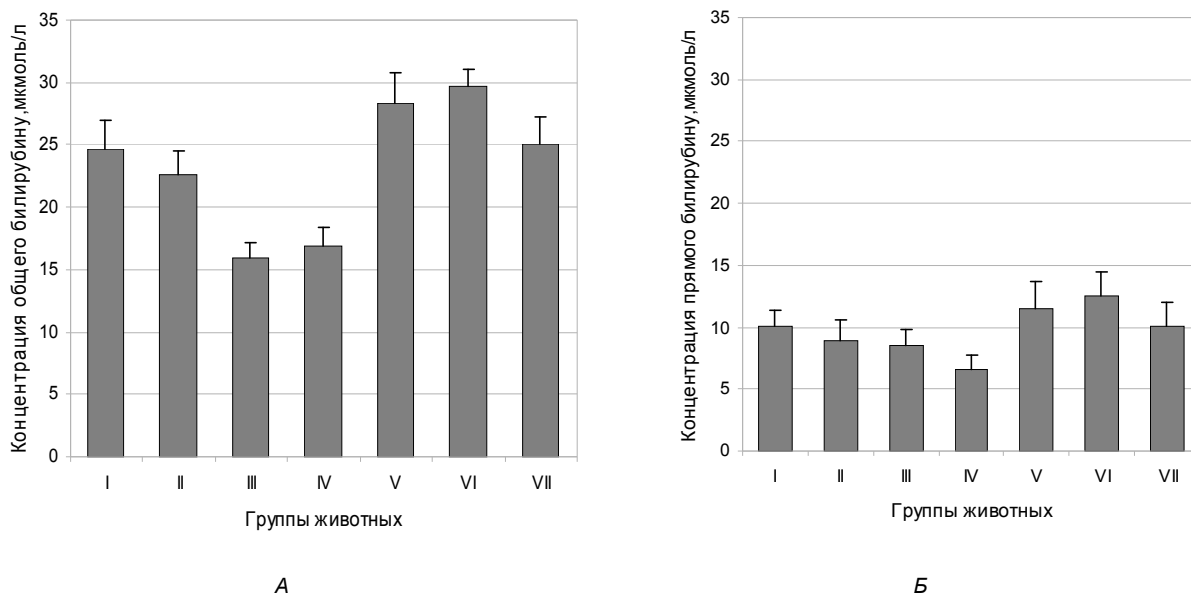


Рис.1. Уровень билирубина общего (А) и прямого (Б) в сыворотке крови интактных животных (I), ложнооперированных (II), с экспериментальным геморрагическим инсультом (ГИ; III-VII), где III –ГИ, IV – ГИ+плацебо, V – ГИ+церебролизин, VI – ГИ+кортексин, VII – ГИ+церебрал.

Одним с физиологически важных показателей есть уровень глюкозы в крови, изменение которой может приводить к развитию патологического состояния. В данном случае, на 7 сутки после индукции ГИ наблюдается

существенное понижение уровня глюкозы почти в 1,8 раз ($p < 0,05$) в сравнение с контрольной и ложнооперированной группами экспериментальных животных (рис.2).

Рис.2

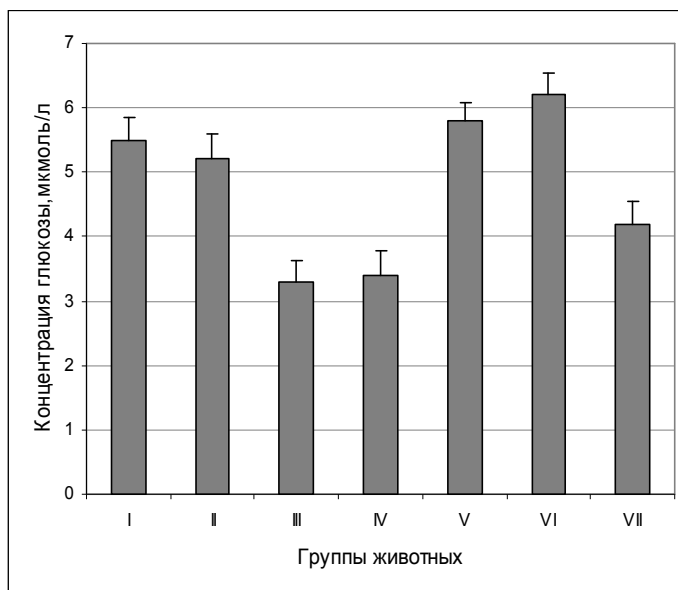


Рис.2. Уровень глюкозы в сыворотке крови интактных животных (I), ложнооперированных (II), с экспериментальным геморрагическим инсультом (ГИ; III-VII), где III –ГИ, IV – ГИ+плацебо, V – ГИ+церебролизин, VI – ГИ+кортексин, VII – ГИ+церебрал.

Показано, что кортексин и церебролизин увеличивали данный показатель почти в 2 раза, тогда как церебрал лишь в 1,2 раза ($p < 0,05$) в сравнении с группой без терапии. В то же время, кортексин и церебролизин нормализовали уровень глюкозы в сравнении с контрольной группой, а церебрал не проявляет такого выраженного эффекта. Что

касается последнего, это может быть связано с тем, что при определении других важных показателей, в частности, иммунологических или непосредственного влияния на первичные культуры эндотелиоцитов было зафиксировано его пролонгированное действие, отличающегося от такового при влиянии церебролизина и кортексина. Возможно, влияние церебрала на

показатели билирубина и глюкозы также имеет подобный механизм, что будет предметом дальнейших исследований.

Литература

1. Shiber J.R. Stroke registry: hemorrhagic vs ischemic strokes / J.R. Shiber, E. Fontane, A. Adewale // *Am J Emerg Med.* – Mar., 2010. – Vol. 28, № 3. – P. 331-333.
2. Aygul R. Plasma oxidants and antioxidants in acute ischaemic stroke / R. Aygul, D. Kotan, F. Demirbas [et al.] // *J. Int. Med. Res.* – 2006. – Vol. 34. – P. 413-418.
3. Clark J.E. Dynamics of heme oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress / J.E. Clark, R. Foresti, C.J. Green [et al.] // *Biochem J.* – 2000. – Vol. 348. – P. 615-619.
4. Dohi K. Transient elevation of serum bilirubin (a heme oxygenase-1 metabolite) level in hemorrhagic stroke: bilirubin is a marker of oxidant stress / K. Dohi, Y. Mochizuki, K. Satoh // *Acta Neurochir Suppl.* – 2003. – Vol. 86. – P. 247-249.
5. Zimmermann C. Antioxidant status in acute stroke patients of stroke risk / C. Zimmermann, K. Winnefeld, S. Streck [et al.] // *Eur Neurol.* – 2004. – Vol. 51. – P. 157-161.
6. Ishikawa K. Induction of heme oxygenase-1 inhibits the monocyte transmigration induced by mildly oxidized LDL / K. Ishikawa, M. Navab, N. Leitinger [et al.] // *J Clin Invest.* – 1997. – Vol. 100. – P. 1209-1216.
7. True A.L. Heme oxygenase-1 deficiency accelerate formation of arterial thrombosis through oxidative damage to the endothelium, which is rescued by inhaled carbon monoxide / A.L. True, M. Olive, M. Boehm [et al.] // *Circ. Res.* – 2007. – Vol. 101. – P. 893-901.
8. Kawamura K. Bilirubin From Heme Oxygenase-1 Attenuates Vascular Endothelial Activation and Dysfunction / K. Kawamura, K. Ishikawa, Y. Wada [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2005. – Vol. 25. – P. 155-160.
9. Vehkavaara S. In vivo endothelial-dysfunction characterizes patients with impaired fasting glucose / S. Vehkavaara, A. Seppala-Lindroos, J. Westerbacka [et al.] // *Diabetes Care.* – 1999. – Vol. 22. – P. 2055-2060.
10. Creager M.A. Diabetes and vascular disease / M.A. Creager, T.F. Luscher, J.A. Beckman // *Circulation.* – 2003. – Vol. 108. – P. 1527-1532.
11. Huang J. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia / J. Huang, U.M. Upadhyay, R.J. Tamargo // *Surg Neurol.* – 2006. – Vol. 66, № 3. – P. 232-245.
12. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. — National Academy Press, Washington, D.C. : National Academy of Press. – 1996. – P. 140.
13. Макаренко А.Н. Метод моделирования локального кровоизлияния в различных структурах головного мозга / Макаренко А.Н., Косицын Н.С., Пасикова Н.В. [и др.] // *Журн. высш. нервн. деят.* — 2002. — Т. 52, № 6. — С. 765-768.
14. Николаенко Т.В. Вплив іонів свинцю на показники гепатобілярної системи та азотистого катаболізму / Т.В. Николаенко, І.В.

Бесараб, Г.О. Почтарьова [та ін.] // *Журнал "Медична хімія".* – 2012. – Т. 3. – С. 60-63.

References

1. Shiber J.R. Stroke registry: hemorrhagic vs ischemic strokes / J.R. Shiber, E. Fontane, A. Adewale // *Am J Emerg Med.* – Mar., 2010. – Vol. 28, № 3. – P. 331-333.
2. Aygul R. Plasma oxidants and antioxidants in acute ischaemic stroke / R. Aygul, D. Kotan, F. Demirbas [et al.] // *J. Int. Med. Res.* – 2006. – Vol. 34. – P. 413-418.
3. Clark J.E. Dynamics of heme oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress / J.E. Clark, R. Foresti, C.J. Green [et al.] // *Biochem J.* – 2000. – Vol. 348. – P. 615-619.
4. Dohi K. Transient elevation of serum bilirubin (a heme oxygenase-1 metabolite) level in hemorrhagic stroke: bilirubin is a marker of oxidant stress / K. Dohi, Y. Mochizuki, K. Satoh // *Acta Neurochir Suppl.* – 2003. – Vol. 86. – P. 247-249.
5. Zimmermann C. Antioxidant status in acute stroke patients of stroke risk / C. Zimmermann, K. Winnefeld, S. Streck [et al.] // *Eur Neurol.* – 2004. – Vol. 51. – P. 157-161.
6. Ishikawa K. Induction of heme oxygenase-1 inhibits the monocyte transmigration induced by mildly oxidized LDL / K. Ishikawa, M. Navab, N. Leitinger [et al.] // *J Clin Invest.* – 1997. – Vol. 100. – P. 1209-1216.
7. True A.L. Heme oxygenase-1 deficiency accelerate formation of arterial thrombosis through oxidative damage to the endothelium, which is rescued by inhaled carbon monoxide / A.L. True, M. Olive, M. Boehm [et al.] // *Circ. Res.* – 2007. – Vol. 101. – P. 893-901.
8. Kawamura K. Bilirubin From Heme Oxygenase-1 Attenuates Vascular Endothelial Activation and Dysfunction / K. Kawamura, K. Ishikawa, Y. Wada [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2005. – Vol. 25. – P. 155-160.
9. Vehkavaara S. In vivo endothelial-dysfunction characterizes patients with impaired fasting glucose / S. Vehkavaara, A. Seppala-Lindroos, J. Westerbacka [et al.] // *Diabetes Care.* – 1999. – Vol. 22. – P. 2055-2060.
10. Creager M.A. Diabetes and vascular disease / M.A. Creager, T.F. Luscher, J.A. Beckman // *Circulation.* – 2003. – Vol. 108. – P. 1527-1532.
11. Huang J. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia / J. Huang, U.M. Upadhyay, R.J. Tamargo // *Surg Neurol.* – 2006. – Vol. 66, № 3. – P. 232-245.
12. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. — National Academy Press, Washington, D.C. : National Academy of Press. – 1996. – P. 140.
13. Makarenko A.N. Metod modelirovaniya lokal'nogo krovoizliyaniya v razlichnykh strukturah golovnoho mozga / Makarenko A.N., Kositsyn N.S., Pasikova N.V. [i dr.] // *Zhurn. vyssh. nervn. deyat.* – 2002. – Т. 52, № 6. – С. 765-768.
14. Nikolaenko T.V. Vpliv ioniv svincyu na pokazniki gepatobiliarnoi sistemi ta azotystoho katabolizmu / T.V. Nikolaenko, I.V. Besarab, G.O. Pochtarova [ta in.] // *Zhurnal "Medichna himiya".* – 2012. – Т. 3. – С. 60-63.

Реферат

КОРЕКЦІЯ РІВНЯ БІЛІРУБІНУ І ГЛЮКОЗИ АНТИІНСУЛЬТНИМИ ПРЕПАРАТАМИ ЯК МЕХАНІЗМ НОРМАЛІЗАЦІЇ СУДИННОЇ ДИСФУНКЦІЇ ЗА ГЕМОРАГІЧНОГО ІНСУЛЬТУ

Ніколаенко Т.В., Гарманчук Л.В., Макаренко А.Н., Сараєва І.В., Петрук Н.А., Джус Е.І., Нікуліна В.В., Ступак Ю.А.

Ключові слова: білірубін, глюкоза, судинна дисфункція, геморагічний інсульт.

Виявлено позитивний корегуючий вплив антиінсультних препаратів Кортексин ("Герофарм", Росія), церебролізін ("Ебеве", Австрія), Церебрал (новий засіб – трофанотропін, Росія) на рівень біохімічних показників сироватки крові щурів з індукованим геморагічним інсультом. Було зафіксовано двократне зниження загального білірубіну у тварин з індукованим ГІ відносно групи інтактних тварин, в той час як препарати нормалізують цей показник (найбільш ефективним був кортексин). Також показано, що кортексин і церебролізін збільшували рівень глюкози в сироватці крові в 2 рази, тоді як церебрал лише в 1,2 рази в порівнянні з групою без терапії.

Summary

CORRECTION OF BILIRUBIN AND GLUCOSE BY ANTI-STROKE AGENTS AS MECHANISM FOR NORMALIZING VASCULAR DYSFUNCTION IN HEMORRHAGIC STROKE

Nikolaenko T.V., Harmanchuk L.V., Makarenko A.N., Sarajeva I.V., Petruk N.A., Juis Ye.I., Nikulina V.V., Stupak Yu.A.

Key words: induced hemorrhagic stroke, glucose levels, blood serum, rats.

The positive correcting effect produced by anti-stroke medicines as Cortexin ("Herofarm", Russia), Cerebrolizin ("Ebewe", Austria), Cerebral (a new agent – trofinotropin, Russia) on the level of biochemical parameters in the blood serum of rats with induced hemorrhagic stroke was described in this paper. There was double fold decrease of total bilirubin in animals with induced HI relative to the intact group of animals, while above mentioned medicines resulted in the normalization of these indicators (Cortexin was observed to be the most effective). It was also shown that Cerebrolizin and Cortexin increased glucose levels in blood serum two-fold, while Cerebral only in 1.2 times compared with the group receiving no therapy.