

УДК 577.24

СИГНАЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ТИОПЕНТАЛОМ НАТРИЯ

© 2014 Е.Г. Батоцыренова¹, В.А. Кашуро¹, Л.В. Минаева¹, А.В. Швецов^{1,2},
С.В. Степанов¹, Н.В. Лапина¹, Е.Ю. Бонитенко¹

¹ Институт токсикологии Федерального Медико-Биологического Агентства России,
г. Санкт-Петербург

² Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН

Поступила в редакцию 10.12.2014

Проведено экспериментальное исследование взаимодействия ферментов антиоксидантной системы, ферментов апоптоза каспазы 3 и 9 и пигментного фактора эпителиального происхождения при внутрибрюшинном введении крысам депримирующего агента тиопентала натрия в дозе LD50.

Ключевые слова: *активная форма кислорода, апоптоз, каспаза 3, каспаза 9, пигментный фактор эпителиального происхождения, депримирующий агент*

Тиопентал натрия широко используется для неингаляционного наркоза средней длительности действия. Главными достоинствами неингаляционного внутривенного наркоза являются быстрота и легкость развития процесса без стадии возбуждения. Отрицательным свойством является трудное регулирование глубины наркоза. Вещества для ингаляционного наркоза после прекращения вдыхания быстро выводятся из организма, тогда как неингаляционные наркотические вещества перестают действовать только после метаболизма в печени и выделения через почки. Поэтому возможны отравления веществами депримирующего действия с выраженным

угнетением функции центральной нервной системы (ЦНС), что в свою очередь приводит к развитию осложнений со стороны органов дыхания, кровообращения и других жизненно важных систем. Данные обстоятельства вызывают увеличение концентрации высокорекреационных сигнальных молекул для адаптации клеточного метаболизма к изменяющимся условиям среды, в том числе и активных форм кислорода (АФК).

Известно, что стационарный уровень свободнорадикальных соединений в клетке достаточно низкий, так как регулируется специальной системой антиоксидантной защиты. В случае отклонения от сбалансированного метаболизма, вызванного применением лекарственного препарата, наблюдается возрастание уровня АФК. Перепроизводство АФК опасно для существования клеточного сообщества и надлежащего выполнения ими соответствующих функций, так как индуцирует апоптоз, чтобы удалить поврежденные структуры [1]. Вероятность такого развития событий при отравлениях депримирующими препаратами на сегодняшний день изучена недостаточно. Поэтому данные исследования являются актуальными для медицинской токсикологии.

Цель исследования: экспериментальное изучение изменения активности ферментов антиоксидантной защиты (супероксиддисмутазы (СОД), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД), глутатионпероксидазы (ГП)), активности ферментов апоптоза каспазы 3 и каспазы 9 и концентрации пигментного фактора эпителиального происхождения (PEDF) в плазме крови крыс в зависимости от стадии интоксикации тиопенталом натрия в дозе LD50.

Батоцыренова Екатерина Геннадьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимической токсикологии и фармакологии. E-mail: BKATERINA2009@yandex.ru

Кашуро Вадим Анатольевич, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией биохимической токсикологии и фармакологии. E-mail: kashuro@yandex.ru

Минаева Любовь Валерьевна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории биохимической токсикологии и фармакологии. E-mail: minaevaliubov@vandex.ru

Швецов Артур, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории генетики. E-mail: Shvetsov83@mail.ru

Степанов Сергей Васильевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимической токсикологии и фармакологии. E-mail: stepanovsv1947@mail.ru

Лапина Наталья Вадимовна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией прикладной токсикологии. E-mail: lapina2005@inbox.ru

Бонитенко Евгений Юрьевич, доктор медицинских наук, директор. E-mail: institute@toxicology.ru

Материалы и методы исследования.

Экспериментальные исследования выполнены на 40 белых беспородных крысах-самцах массой 180-220 г из питомника РАМН «Рапполово». Длительность карантина (акклиматизационного периода) для животных составляла 14 дней. Содержание и использование животных в эксперименте проводилось согласно норм GLP. В контрольной и каждой экспериментальной группах было по 10 животных. Введение тиопентала натрия производили внутривенно в дозе LD₅₀ за 6, 24 и 72 часа до взятия биологического материала. Для взятия материала для исследований от лабораторных животных производили декапитацию крыс и собирали кровь в гепаринизированные пробирки. Полученную кровь центрифугировали в течение 10 мин в центрифуге при 3000 об/мин и температуре +4°C. В плазме крови экспериментальных животных определяли концентрацию PEDF (тест-система фирмы «Chemicon international», USA&Canada), активность каспазы-3 и каспазы-9 (тест-система фирмы eBioscience, Austria) с помощью иммуноферментного анализа на приборе Immunotech.

После отделения плазмы эритроцитарную взвесь трехкратно отмывали холодным физиологическим раствором, а затем центрифугировали в соответствии с методиками проведения данных исследований указанных в наборах фирмы «Randox». Гемолиз эритроцитов осуществляли добавлением эритроцитарной взвеси в 5 мМ ТРИС-НСI буфер с pH 7,6 в соотношении 1:9. Гемолизируемая кровь выдерживалась в

течение 30 мин при +4°C. Полученный гемолизат использовали для определения биохимических показателей антиоксидантной системы: активности супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГП) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД). Для определения активности ферментов антиоксидантного статуса были использованы наборы фирмы «Randox» (Великобритания). Контроль качества выполняемых методик проводили с использованием контрольных материалов фирмы «Randox». Результаты исследований были обработаны при помощи пакета статистического анализа данных «Statistica».

Полученные результаты и их обсуждение. В результате проведенного исследования были получены следующие результаты, представленные в табл. 1. Тиопентал натрия – производное тиобарбитуровой кислоты, в зависимости от дозы разнонаправленно изменяет активность ГАМКА-зависимого быстрого ионотропного канала на постсинаптической мембране нейронов головного мозга. В больших дозах (LD₅₀) непосредственно активирует ГАМКА-рецепторы, оказывая ГАМК-стимулирующее действие. Препарат увеличивает интенсивность метаболических процессов в головном мозге, утилизацию мозгом глюкозы и кислорода. В больших дозах угнетает дыхательный центр и уменьшает его чувствительность к углекислому газу [2].

Таблица 1. Полученные результаты

Название показателя	6 часов	24 часа	72 часа	контроль
супероксиддисмутазы, Е/гНв	145±18,1* (↓90%)	528,5±78,4* (↓80%)	734,1±151,3*(↓60%)	1917,5±518,4
глюкозо-6- фосфат-дегидрогеназа, Е/гНв	2,9±0,6 (↓17%)	2,9±0,1(↓17%)	2,4±0,2* (↓32%)	3,5±0,2
глутатионпероксидаза, Е/гНв	28,2±0,9 (↓4%)	33,4±1,9(↑13%)	41,5±0,9 (↑41%)	29,4±0,9
каспаза 3, ng/ml	1,05±0,13*(↑30%)	1,25±0,05*(↑54%)	1,19±0,46*(↑47%)	0,81±0,03
каспаза 9,pg/ml	51,8±31,7* (↑174%)	32,2±23,2* (↑70%)	44,4±14,2 * (↑235%)	18,9±13,6
PEDF pg/ml	14,3±1,2* (↓92%)	26,5±3,91* (↓85%)	28,8±0,5* (↓84%)	179,37±85,86

Примечание: * – достоверные различия по сравнению с контролем (p<0,05)

В условиях воздействия на экспериментальных животных тиопенталом натрия активность ферментов антиоксидантной защиты в гемолизате эритроцитов крысы отражала процессы запуска масштабного окислительного стресса. Основной причиной служит образование АФК – кислорода, восстановленного до супероксида кислорода и перекиси водорода. Обе эти формы являются предшественниками гидроксил-радикала OH[•], сильнейшего окислителя, разрушающего

все жизненно важные структуры живой клетки, включая ДНК [3].

СОД – антиоксидантный фермент, металлопротеин, представляет первое звено защиты при увеличении концентрации активных молекул кислорода в клетке. Полученные экспериментальные данные показали, что активность СОД резко снижается и продолжает оставаться на предельно низком функциональном уровне во все временные интервалы исследования. Снижение

активности СОД на 60% к 3 суткам указывает на значимость быстрой истощаемости естественных антиоксидантных систем в реализации повреждающего потенциала оксидативного стресса.

Следующим звеном в процессе утилизации АФК являются ферменты системы глутатиона. Биологическое значение системы глутатиона многообразно и затрагивает почти все стороны жизнедеятельности клетки. Например, конъюгация ксенобиотиков и их метаболитов, защита от повреждающего действия АФК, поддержание тиол-дисульфидного равновесия и восстановленной среды клетки, поддержание гемоглобина эритроцитов в восстановленном состоянии, восстановление метгемоглобина и защита эритроцитов от гемолиза, транспорт аминокислот через клеточную мембрану, поддержание оптимального состояния и функций биологических мембран и т.д. [4]. К ферментам обмена глутатиона относится глутатионпероксидаза, принимающая участие в регуляции тиол-дисульфидного равновесия в клетке. ГП – селеногликопротеин, не связанный с мембранами, присутствует в цитозоле клеток и практически во всех органеллах, катализирует восстановление H_2O_2 и водорастворимых органических гидроперекисей (алифатических и циклических углеводородов, полиненасыщенных жирных кислот, глицерина, холестерина, прогестерона, простагландинов и т.д.). В проведенном эксперименте через 6 часов активность глутатионпероксидазы незначительно снижалась на 4% по сравнению с контрольной группой. Через 24 часа активность фермента повышалась на 13% по сравнению с показателями контрольной группы. К концу третьих суток (72 часа) активность фермента возрастала на 41% к значениям контрольной группы.

В процессе утилизации перекисей глутатионпероксидаза в качестве кофактора использует восстановленный глутатион, который в результате превращается в окисленный. Для обратного превращения окисленного глутатиона в восстановленный необходимо достаточное количество восстановленного НАДФН⁺, источником которого являются реакции окислительной части пентозофосфатного шунта. Ключевым и скоростью лимитирующим ферментом пентозофосфатного пути в эритроцитах является фермент глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа. Снижение активности Г-6-ФД может приводить к дефициту НАДФН⁺ и восстановленного глутатиона, а это приводит к уменьшению скорости восстановления окисленных SH-групп и как следствие, к инактивации ферментов и различных SH-содержащих белков. Активность данного фермента снижалась к концу 6-ти часового интервала на

17% по сравнению с показателями контрольных значений. К концу первых суток активность фермента оставалась на том же пониженном уровне. К концу третьих суток активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы продолжила падение и составила 68% по сравнению с уровнем контрольных значений.

В зависимости от уровня АФК и метаболических изменений возможны различные варианты развития «сценария» при отравлении тиопенталом натрия в дозе LD₅₀. Активация компенсаторных механизмов приводит к инициации ангиогенеза, пролиферации и соответственно, выживанию организма. Срыв адаптивных возможностей запускает нарастающую деструкцию клеток по механизму некроза или апоптоза, соответственно, гибель организма. Образование АФК, стимулируемое в клетках при участии ксантиноксидазы, eNOS, NAD(P)H оксидазы, активирует сигнальные белки тирозинкиназы (p38MAPK, JNK), связанные в свою очередь, с транскрипционными факторами ядерного аппарата клетки (NF-κB, STAT1) [5]. NF-κB является одним из главных транскрипционных факторов, отвечающих за адаптивные реакции клеток.

В нашем исследовании, исходя из полученных данных, развитие событий пошло по пути развития апоптоза, так как активность ферментов апоптотического каскада, каспазы 3 и каспазы 9 в плазме крови крыс резко повышается по сравнению с контрольными значениями [6]. Активность каспазы-3 повышается через 6 часов на 30%, в то же время активность каспазы 9, главного «регулятора» активности каспазы 3, повышается на 175% по сравнению с контрольными значениями. Развитие процесса приводит к нарастанию активностей этих ферментов. Интересно, что к окончанию первых суток активность каспазы 9 еще раз резко повышается, в 1,34 раза по сравнению с уровнем активности на 6 часов.

Фактором, защищающим нейрональные клетки от апоптоза, является PEDF. Известно, что PEDF – ингибитор сериновых протеаз, является одним из факторов защиты клеток от апоптоза, что предполагает участие данного гликопротеина в разных процессах жизнедеятельности клетки [7]. В работах Yamagishi et al. описаны пролиферативные изменения, вызванные эпителиальным ростовым фактором (PEDF) при окислительном стрессе в клетках эндотелия при диабетической ретинопатии [8]. В проведенном исследовании концентрация PEDF в плазме крови крыс резко снижается. Через 6 часов после отравления содержание PEDF на 92% ниже уровня контрольных значений. Такая тенденция сохраняется в течение первых суток и уровень PEDF составляет 15% от контрольных значений. По

некоторым данным основой механизма анти-апоптотического действия PEDF на нейроны является активация транскрипционного фактора NF-κB [9]. Полученные результаты подтверждают роль данного фактора в регуляции процессов апоптоза.

Выводы: выявлено, что отравление тиопенталом натрия крыс в дозе LD₅₀ приводит к увеличению концентрации АФК в клетке и активации сигнальных тирозинкиназ. Данный процесс сигнализирует о срыве адаптивных возможностей организма, проявляющемся в снижении активности ферментов антиоксидантной защиты СОД и Г-6-ФД, повышении активности проапоптотических ферментов каспазы 9 и каспазы 3, а также снижении содержания нейротрофического фактора PEDF.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Powers, S.K. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle / S.K. Powers, E.E. Talbert, P. Adhietty // *Physiol.* 2011. № 589. С. 2129-2138.
2. Справочник Видаль 2014. Лекарственные препараты в России. Vidal 2014. – М.: ЮБМ Медика Рус, 2014. 1600 с.
3. Скулачев, В.П. Кислород и явления запрограммированной смерти // Первое Северинское чтение. – М.: МГУ, 2000. 300 с.
4. Кацууро, В.А. Состояние системы глутатиона и перекисного окисления липидов в тканях печени и почек при острых отравлениях циклофосфаном / В.А. Кацууро, А.И. Карпищенко, С.И. Глушков и др. // *Нефрология.* 2006. №2. С. 81-85.
5. Гомазков, О.А. Нейротрофическая регуляция и стволовые клетки мозга. – М.: Издательство ИКАР, 2006. 332 с.
6. Xiao, B. Single-prolonged stress induces apoptosis by activating cytochrome C/caspase-9 pathway in a rat model of post-traumatic stress disorder / B. Xiao, B. Yu, H.T. Wang et al. // *Cell Mol. Neurobiol.* 2011. V. 31, № 1. P. 37-43.
7. Минкевич, Н.И. PEDF – неингибиторный серпин с нейропротекторной и антиангиогенной активностями / Н.И. Минкевич, В.М. Липкин, И. Костанян // *А. Acta natural.* 2010. № 3. С. 74-84.
8. Yamagishi, S. Pigment epithelium-derived factor inhibits leptin-induced angiogenesis by suppressing vascular endothelial growth factor gene expression through antioxidative properties / S. Yamagishi, S. Amano, Y. Inagaki et al. // *Microvasc Res.* 2003. V. 65, №3. P. 186-190.
9. Yabe, T. NF-kappaB activation is required for the neuroprotective effects of pigment epithelium-derived factor (PEDF) on cerebellar granule neurons / T. Yabe, D. Wilson, J.P. Schwartz // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. P. 43313-43319.

SIGNAL FUNCTION OF OXYGEN ACTIVE FORMS AT SODIUM THIOPENTAL INTOXICATION

© 2014 E.G. Batotsyrenova¹, V.A. Kashuro¹, L.V. Minayeva¹, A.V. Shvetsov^{1,2},
S.V. Stepanov¹, N.V. Lapina¹, E.YU. Bonitenko¹

¹ Institute of Toxicology of Federal Medical Biological Agency of Russia,
St. Petersburg

² Institute of Physiology named after I.P. Pavlov RAS

The experimental study of interaction of enzymes of antioxidant system, enzymes of caspase 3, 9 and pigment epithelium-derived factor (PEDF) apoptosis is conducted at intraperitoneal injection to rats the median lethal dose (LD50) of sodium thiopental.

Key words: *oxygen active form, apoptosis, caspase 3, caspase 9, pigment epithelium-derived factor, deprivation substance*

Ekaterina Batotsyrenova, Candidate of Biology, Senior Research Fellow at the Biochemical Toxicology and Pharmacology Laboratory. E-mail: BKATERINA2009@yandex.ru; Vadim Kashuro, Doctor of Medicine, Head of the Biochemical Toxicology and Pharmacology Laboratory. E-mail: kashuro@yandex.ru; Lyubov Minaeva, Candidate of Medicine, Research Fellow at the Biochemical Toxicology and Pharmacology Laboratory. E-mail: minaevaliubov@vandex.ru; Arthur Shvetsov, Candidate of Biology, Research Fellow at the Genetics Laboratory. E-mail: Shvetsov83@mail.ru; Sergey Stepanov, Candidate of Medicine, Leading Research Fellow at the Biochemical Toxicology and Pharmacology Laboratory. E-mail: stepanovsv1947@mail.ru; Nataliya Lapina, Candidate of Medicine, Head of the Applied Toxicology Laboratory. E-mail: lapina2005@inbox.ru; Evgeniy Bonitenko, Doctor of Medicine, Director. E-mail: institute@toxicology.ru