

УДК 615.272

# ИССЛЕДОВАНИЕ СОЧЕТАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ТИОПЕНТАЛА НАТРИЯ И ДЕЛЬТА-СОН ИНДУЦИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА НА АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ КРЫС

А.В. Швецов<sup>1</sup>, Е.Г. Батоцыренова<sup>1</sup>,  
Н.А. Дюжикова<sup>2</sup>, В.А. Кашиуро<sup>1</sup>,  
Н.В. Лапина<sup>1</sup>, В.Б. Долго-Сабуров<sup>1</sup>,  
М.Б. Иванов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт токсикологии»  
Федерального медико-биологического  
агентства России, 192019,  
г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт физиологии  
им. И.П. Павлова» Российской академии  
наук, 199034, г. Санкт-Петербург,  
Российская Федерация

Проведено биохимическое исследование активности ферментов антиоксидантной защиты крыс в разные сроки после введения тиопентала натрия и дельта-сон индуцирующего пептида. Показано, что тиопенталовая кома сопровождалась снижением уровня супероксиддисмутазы (6 и 24 часа после воздействия) и повышением уровня каспазы-3 (через 6 часов после воздействия) в плазме крови крыс. Фармакологическая коррекция с помощью ДСИП вызывала снижение уровня супероксиддисмутазы (6 и 24 часа после воздействия), глутатионпероксидазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (через 6 часов).

**Ключевые слова:** тиопентал натрия, тиопенталовая кома, антиоксидантная защита, дельта-сон индуцирующий пептид.

**Введение.** Тиопентал натрия широко используется для неингаляционной анестезии средней длительности действия, основными достоинствами которой являются быстрота и легкость развития наркотического сна без стадии возбуждения. Вместе с тем, в отличие от препаратов для ингаляционного наркоза, метаболизм неингаляционных наркотических веществ в печени и последующая элиминация продуктов их распада через почки происходит гораздо медленнее, что повышает риск значительного угнетения жизненно важных функций с развитием патологии дыхательной и сердечно-сосудистой систем [1, 2]. На клеточном уровне, это проявляется в увеличении концентрации высокореакционных сигнальных молекул, в частности активных форм кислорода (АФК), избыточное появление которых в норме инактивируется системой антиоксидантной защиты (АОС)

[3, 4]. Избыток АФК опасен для существования клеточных популяций и их функционального статуса, так как может индуцировать митохондриальный сигнальный путь апоптоза [5].

С позиций цитопротекторной терапии токсических поражений нервной системы перспективным для изучения классом соединений представляются пептидные биорегуляторы, среди которых выраженный нейропротекторный и адаптогенный эффект был показан для дельта-сон индуцирующего пептида (ДСИП) [6, 7].

**Целью работы** явилось исследование комбинированного воздействия дельта-сон индуцирующего пептида и тиопентала натрия на антиоксидантную систему крыс.

**Материал и методы исследования.** Экспериментальное исследование выполнено на белых беспородных крысах-самцах массой 180-220 г из

**Швецов Артур Вячеславович (Shvetsov Artur Vyacheslavovich)**, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биохимической токсикологии и фармакологии ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», 192019, г. Санкт-Петербург, e-mail: shvetsov83@mail.ru

**Батоцыренова Екатерина Геннадьевна (Batotsyrenova Ekaterina Gennadievna)**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимической токсикологии и фармакологии ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», 192019, г. Санкт-Петербург, e-mail: bkaterina2009@yandex.ru

**Дюжикова Наталия Алевковна (Dyuzhikova Natalia Alekovna)**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией генетики ВНД ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» Российской академии наук, e-mail: dyuzhikova@mail.ru

**Кашиуро Вадим Анатольевич (Kashuro Vadim Anatolievich)**, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией биохимической токсикологии и фармакологии ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», 192019, г. Санкт-Петербург, e-mail: kashuro@yandex.ru

**Лапина Наталия Вадимовна (Lapina Nataliya Vadimovna)**, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории токсикологии ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», 192019, г. Санкт-Петербург, e-mail: lapina2005@inbox.ru

**Долго-Сабуров Валерий Борисович (Dolgo-Saburov Valeriy Borisovich)**, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лабораторией биохимической токсикологии и фармакологии ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», 192019, г. Санкт-Петербург.

**Иванов Максим Борисович (Ivanov Maksim Borisovich)**, доктор медицинских наук, директор ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», 192019, г. Санкт-Петербург, e-mail: m.b.ivanov@toxicology.ru

питомника РАМН «Рапполово». Длительность акклиматизационного периода для животных составляла 14 дней. Содержание и использование животных в эксперименте проводилось согласно нормам GLP. В контрольной и каждой экспериментальной группах было обследовано по 10 животных. Введение тиопентала натрия производили внутривенно в дозе LD<sub>50</sub> (85 мг/кг). ДСИП вводился интраназально в дозе 150 мкг/кг за 5 мин до введения тиопентала натрия.

Эвтаназию экспериментальных животных проводили через 6 и 24 часа. Кровь собирали в гепаринизированные пробирки. Для разделения плазмы и эритроцитов полученную кровь центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин и температуре +4°C. После отделения плазмы эритроцитарную взвесь троекратно отмывали холодным физиологическим раствором. Гемолиз эритроцитов осуществляли добавлением к эритроцитарной взвеси 5 мМ ТРИС-НСl буфер с рН 7,6 в соотношении 1:9. Гемолизирующая 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-ФДГ) с помощью наборов фирмы «Randox» (Великобритания).

В плазме крови экспериментальных животных определяли концентрацию каспазы-3 (наборы для определения каспазы-3 eBioscience, Austria) с помощью иммуноферментного анализа на приборе Immunochem 2000.

Для статистической обработки результатов использовали программное обеспечение R studio.

Для представления данных использовали среднее значение и ошибку среднего ( $m \pm sem$ ). Проверка отклонения распределения выборок от нормального осуществлялась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для оценки достоверности различий между исследуемыми характеристиками экспериментальных групп использовался U-критерий Манна-Уитни с уровнем значимости равным 0,05.

**Результаты и обсуждение.** Экспериментальное исследование состояния АОС после введения изучаемых препаратов показало достоверные изменения активности всех исследуемых ферментов в гемолизате эритроцитов. Характер их изменений, однако, отличался. Так, супероксиддисмутаза спустя 6 часов после воздействия тиопентала натрия характеризовалась резким снижением активности, которое через 24 часа сменилось достоверной тенденцией к восстановлению (табл. 1). Введение дельта-сон индуцирующего пептида также приводило к достоверному снижению активности супероксиддисмутазы через 6 часов, которое, однако, носило гораздо менее выраженный характер. Через 24 часа, в отличие от животных, которым вводили только тиопентал, не было отмечено тенденции к восстановлению исходной активности фермента.

Активность глутатионпероксидазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, напротив, не отличалась от контрольных значений через 6 и 24 часов после введения тиопентала, в то время как коррекция ДСИП вызывала достоверное снижение активности обоих ферментов через 6 часов после воздействия. Через 24 часа активность Г-6-ФДГ вернулась к значениям контрольной группы, в то время как активность глутатионпероксидазы

Таблица 1

**Динамика исследуемых показателей в плазме крови в разные временные интервалы после наступления экспериментальной комы**

Показатель	6 часов		24 часа		контроль
	Тиопентал	Тиопентал +ДСИП	Тиопентал	Тиопентал +ДСИП	
Супероксид-дисмутаза, Е/гНв	145,0±18,1*	1197,7±413,0*#	528,5±78,4*	1008,9±296,0*	2268,8±467,1
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, Е/гНв	2,9±0,6	2,3±0,3*	2,9±0,1	3,0±0,2	3,5±0,2
Глутатионпероксидаза, Е/гНв	28,2±0,9	25,6±0,9*#	33,4±1,9	36,4±0,9*#	29,4±0,9
Каспаза 3, нг/мл	1,05±0,13*	0,95±0,1	0,86±0,05	0,83±0,04	0,81±0,03

Примечание: \*-достоверное отличие от контрольной группы  
#-достоверное отличие от группы крыс, получавших тиопентал натрия.

была достоверно выше, чем в контрольной группе.

Изучение апоптотической активности показало, что развитие тиопенталовой комы сопровождалось достоверным увеличением концентрации каспазы-3 через 6 часов после интоксикации, однако, после 24 часа, значения возвращаются к норме. При введении ДСИП достоверных изменений экспрессии каспазы-3 в исследуемых временных точках зарегистрировано не было.

Известно, что образование активных форм кислорода является неотъемлемой частью нормального метаболизма живой клетки. Благодаря высокой реакционной способности, обусловленной химической структурой, АФК в норме играют регулируемую роль во внутриклеточных сигнальных путях. Однако, из-за способности реагировать с практически всеми органическими молекулами, в том числе и нуклеиновыми кислотами, при избыточном синтезе АФК инициируется масштабный оксидативный стресс, что в свою очередь приводит к структурно-функциональным клеточным нарушениям и последующей гибели клеток [8].

Регуляция метаболизма АФК осуществляется с помощью многокомпонентной антиоксидантной системы, от функционального состояния которой во многом зависит устойчивость организма к различным воздействиям, провоцирующим оксидативный стресс [9].

Настоящее исследование некоторых показателей антиоксидантного статуса крыс в состоянии экспериментальной комы после введения тиопентала натрия и дельта-сон индуцирующего пептида включало изучение динамики компонентов ферментативного звена антиоксидантной защиты в крови – супероксиддисмутазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глутатионпероксидазы, а также компонента митохондриального сигнального пути апоптоза – каспазы-3.

Было показано, что разные компоненты антиоксидантной защиты обладают неодинаковой реактивностью в ответ на воздействие тиопентала натрия. Так, было отмечено более чем 10-кратное снижение активности СОД по сравнению с контрольной группой через 6 часов после введения токсиканта. В то же время активность глутатионпероксидазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы практически не менялась. Через 24 часа была отмечена выраженная тенденция к восстановлению активности СОД, а активность глутатионпероксидазы и Г-6-ФД значимых изменений не претерпевала.

Воздействие ДСИП на фоне интоксикации тиопенталом приводило к менее выраженному снижению активности СОД, что может указывать на цитопротекторное действие нейропептида. Однако, подобное свойство ДСИП нивелирова-

лось последующим отсутствием тенденции к восстановлению активности фермента спустя 24 часа после введения тиопентала, что, возможно, объясняется однократным введением пептида.

На этом фоне статистически достоверное снижение активности глутатионпероксидазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы через 6 часов после начала эксперимента при фармакологической коррекции ДСИП выглядит парадоксальным. Тем не менее, через 24 часа активность Г-6-ФД восстанавливалась до контрольных значений, а глутатионпероксидазы была достоверно выше на 23,8% по сравнению с контролем.

Нарушение баланса между продукцией и утилизацией свободных радикалов и последующий оксидативный стресс может являться причиной активации апоптотического процесса. Проведенное исследование потенциальной активации апоптотического процесса как следствия оксидативного стресса, позволило установить, что через 6 часов после интоксикации тиопенталом натрия наблюдалось повышение концентрации каспазы-3 в плазме крови, имеющее достоверный характер, которая через 24 часа возвратилась к уровню контрольной группы. При введении ДСИП достоверного изменения уровня продукции каспазы-3 отмечено не было.

Таким образом, к положительным эффектам коррекции последствий введения анестетика с помощью ДСИП можно отнести менее выраженное снижение активности супероксиддисмутазы, а также отсутствие изменений в экспрессии каспазы-3, что указывает на течение апоптотического процесса в рамках нормы. Однако, достоверное уменьшение активности ферментов глутатионредуктазной /глутатионпероксидазной системы после 6 часов, а также отсутствие тенденции к восстановлению концентрации СОД в течение 24 часов после воздействия нейротоксикантом скорее свидетельствуют о негативном эффекте комбинированного воздействия анестетика и пептида.

Ранее была высказана гипотеза о возможном регулирующем воздействии ДСИП на активные участки ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов [10]. По мнению авторов, ДСИП, наряду с другими регуляторными нейропептидами, может выполнять роль вспомогательного звена химической регуляции с последующим усилением, среди прочего, тормозящего влияния барбитуратов. Исходя из этого предположения, в случае отравления тиопенталом натрия, ДСИП мог усилить ГАМК-опосредованное синаптическое торможение и пролонгировать токсическое действие тиопентала, что выразилось в более глубоком повреждающем воздействии глутатионредуктазной /глутатионпероксидазной системы оксидантной защиты в первые 6 часов после воздействия токсиканта. Известно,

что оценка уровня экспрессии генов и генетических полиморфизмов, кодирующих ГАМК-рецепторы, позволяют прогнозировать глубину интоксикации, поэтому изучение генетических особенностей организма позволит осуществить прогноз реакции на воздействие ксенобиотика [11].

**Заключение.** Таким образом, несмотря на внушительный накопленный массив данных, который свидетельствует о ряде положительных

эффектов дельта-сон индуцирующего пептида, в том числе стресслимитирующих, настоящая работа показывает неоднозначную реакцию антиоксидантной системы крыс в состоянии тиопенталовой комы на воздействие данного пептида. Полученные результаты исследования в целом согласуются с данными о возможности использования некоторых показателей системы антиоксидантной защиты для оценки тяжести интоксикации ксенобиотиками [12].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Башарин В. А. Проблемы моделирования коматозных состояний в эксперименте. Вестник Российской военно-медицинской академии. 2008; 3:156.
2. Башарин В. А., Гребенюк А. Н., Бонитенко Е. Ю., Иванов М. Б., Макарова Н. В. Экспериментальная модель барбитуратной комы. Токсикологический вестник. 2010; 4: 21-25.
3. Кашуро В. А., Долго-Сабуров В. Б., Дагаев С. Г., Батоцыренова Е. Г., Кубарская Л. Г., Аксенов В. В. Изучение роли антиоксидантной системы и перекисного окисления липидов в патогенезе тиопенталовой комы. Химическая и биологическая безопасность. 2012; S: 3-7.
4. Батоцыренова Е. Г., Кашуро В. А., Минаева Л. В., Швецов А., Степанов С. В., Лапина Н. В. и др. Сигнальная функция активных форм кислорода при интоксикации тиопенталом натрия. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. Социальные, гуманитарные, медико-биологические науки. 2014; 16(5-4): 1376-1379.
5. Швецов А. В., Дюжихова Н. А., Савенко Ю. Н., Батоцыренова Е. Г., Кашуро В. А. Влияние экспериментальной комы на экспрессию белка bcl-2 и каспаз -3,9 в мозге крыс. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015;160(8): 178-181.
6. Головки А. И., Баринов В. А., Башарин В. А., Бонитенко Е. Ю., Иванов М. Б., Головки С. И., Лапина Н. В. Механизмы фармакологической активности антидепрессивных средств. Medline. 2012;13(1): 157-184.
7. Башарин В. А., Иванов М. Б., Бонитенко Е. Ю. Подходы к коррекции нарушений гомеостаза при токсических комах в эксперименте. Вестник Российской военно-медицинской академии. 2008; 3: 190.
8. Кашуро В. А. Система глутатиона и перекисное окисление липидов в патогенезе острых тяжелых интоксикаций циклофосфаном. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. СПб.: Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова.2003.
9. Кашуро В. А., Глушков С. И., Куценко С. А., Карпищенко А. И., Новикова Т. М., Аксенов В. В. и др. Состояние системы глутатиона в тканях печени крыс при острых отравлениях циклофосфаном. Токсикологический вестник. 2003; 4: 25-30.
10. Иванов М. Б., Башарин В. А., Бонитенко Е. Ю., Войтенков Б. О., Сидоров С. П., Иванов И. М. Влияние дельта-сон индуцирующего пептида на ГАМКА - рецепторные структуры в эксперименте. Medline. 2005; 6(1): 662-672.
11. Осецкина Н. С., Назаров Г. В., Бонитенко Е. Ю., Иванов М. Б., Кашуро В. А., Лапина Н. В. и др. Влияние экспрессии и полиморфизма генов, кодирующих ГАМК-рецепторы на тяжесть депримирующего действия этанола у крыс. Токсикологический вестник. 2014; 6: 22-27.
12. Кашуро В. А., Карпищенко А. И., Куценко С. А., Глушков С. И. Возможность использования определения показателей системы глутатиона в лабораторной диагностике осложнений курсового лечения циклофосфаном. Клиническая лабораторная диагностика. 2002; 10: 43.

## REFERENCES:

1. Basharin V.A. Understanding of coma modeling in an experiment. Vestnik Rossijskoj voenno-medicinskoj akademii. 2008; 3:156.
2. Basharin V.A., Grebenjuk A.N., Bonitenko E.Ju., Ivanov M.B., Makarova N.V. Experimental model of barbiturate coma. Toksikologicheskij vestnik. 2010; 4: 21-25.
3. Kashuro V.A., Dolgo-Saburov V.B., Dagaev S.G., Batotsyrenova E.G., Kubarskaja L.G., Aksenov V.V. Role of antioxidant system and lipid peroxide oxidizing in thiopental - induced coma pathogenesis. Himicheskaja i biologicheskaja bezopasnost'. 2012; S: 3-7.
4. Batotsyrenova E.G., Kashuro V.A., Minaeva L.V., Shvetsov A., Stepanov S.V., Lapina N.V. et al. Signal function of oxygen active forms in sodium thiopental intoxication. Social'nye, gumanitarnye, mediko-biologicheskie nauki. 2014; 16(5-4): 1376-1379.
5. Shvetsov A.V., Duzhikova N.A., Savenko Ju.N., Batotsyrenova E.G., Kashuro V.A. Effects of experimental coma on the expression of bcl-2 protein and caspases 3 and 9 in rat brain. Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny. 2015;160(8): 178-181.
6. Golovko A.I., Barinov V.A., Basharin V.A., Bonitenko E.Ju., Ivanov M.B., Golovko S.I. et al. Pharmacological activity of the amethystic agents. Medline. 2012;13(1): 157-184.
7. Basharin V.A., Ivanov M.B., Bonitenko E.Ju. Approaches to correction of homeostasis impairments in experimental toxic coma states. Vestnik Rossijskoj voenno-medicinskoj akademii. 2008; 3: 190.
8. Kashuro V.A. Glutathione system and lipid peroxide oxidizing in acute severe intoxication caused by cyclophosphan. Dr. med. sci.diss. Saint-Petersburg; 2003.
9. Kashuro V.A., Glushkov S.I., Kutsenko S.A., Karpischenko A.I., Novikova T.M., Aksenov V.V. et al. The state of glutathione system in the rat liver under severe cyclophosphan intoxication. Toksikologicheskij vestnik. 2003; 4: 25-30.
10. Ivanov M.B., Basharin V.A., Bonitenko E.Ju., Voitenkov B.O., Sidorov S.P., Ivanov I.M. The influence of delta sleep-inducing peptide to GABAA - structures in experiment. Medline. 2005; 6(1): 662-672.
11. Osechkina N.S., Nazarov G.V., Bonitenko E.Ju., Ivanov M.B., Kashuro V.A., Lapina N.V. The expression and polymorphism influence of genes encoding the GABA receptors on severity of the ethanol depressing action in rats. Toksikologicheskij vestnik. 2014; 6: 22-27.
12. Kashuro V.A., Karpischenko A.I., Kutsenko S.A., Glushkov S.I. Evaluating of using glutathione system parameters in diagnostics of complications after cyclophosphan treatment. Klinicheskaja laboratornaja diagnostika. 2002; 10: 43.

A.V. Shvetsov<sup>1</sup>, E.G. Batotsyrenova<sup>1</sup>, N.A. Dyuzhikova<sup>2</sup>, V.A. Kashuro<sup>1</sup>, N.V. Lapina<sup>1</sup>, V.B. Dolgo-Saburov<sup>1</sup>, M.B. Ivanov<sup>1</sup>

## STUDY OF THE COMBINED INFLUENCE OF SODIUM THIOPENTAL AND DELTA SLEEP-INDUCING PEPTIDE ON THE ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEM IN RATS

<sup>1</sup>Institute of toxicology, Federal Medical and Biological Agency, 192019, Saint-Petersburg, Russian Federation  
<sup>2</sup>I.P. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 199034, Saint-Petersburg, Russian Federation

A biochemical investigation was performed into activity of rat antioxidant defense enzymes at different time interval after administration of sodium thiopental and delta-sleep-inducing peptide (DSIP). It was shown that thiopental coma was accompanied by a decreased level of superoxide dismutase ( 6 and 24 h after exposure) and increased level of caspase-3 ( 6 h after exposure) in the rat blood plasma. A pharmacological correction with DSIP induced a decrease of the level of superoxide dismutase ( 6 and 24 h after exposure), glutathione peroxidase and glucose 6-phosphate dehydrogenase (after 6h).

**Keyword:** sodium thiopental, thiopental coma, antioxidant defense, delta sleep-inducing peptide.

Материал поступил в редакцию 30.09.2016 г.