

ВЛИЯНИЕ ТИОПЕНТАЛА НАТРИЯ НА СОСТОЯНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ

Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца (г. Киев)

savosko_s@ukr.net

Исследование является фрагментом комплексной научно-исследовательской работы кафедры гистологии и эмбриологии Национального медицинского университета имени А.А. Богомольца: «Органы нервной, иммунной и мочеполовой системы в условиях экспериментального повреждения», № государственной регистрации 0112U001413.

Вступление. Актуальной задачей современной нейронауки является влияние средств наркоза на физиологические показатели организма [3,5,7]. В основе наркоза лежат определенные нарушения взаимоотношений нервных центров вследствие подавляющего действия нейротропных веществ на процессы возбудимости и проводимости клеточных образований мозга. Системный наркоз подавляет физиологические функции и анализаторы – двигательного, зрительного, слухового, вестибулярного, обонятельного, вкусового, interoцептивного. Однако уровень энергообмена и особенностей изменения биохимических маркеров окислительно-восстановительного состояния в ЦНС при воздействии общих анестетиков, а также закономерности биохимических основ выхода из наркоза и восстановления организма изучены недостаточно.

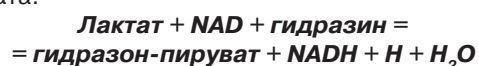
Цель исследования – оценить влияние тиопентала натрия на биохимические показатели энергообмена ткани мозга на уровне лактата, пирувата и соотношение свободных NAD/NADH пар.

Объект и методы исследования. Исследования проведены на белых крысах самцах (средний вес 225±10 г). Тиопентал натрия вводили интраперитонеально (i.p.) в дозе 30 мг/кг. Через определенный промежуток времени (30 сек, 1, 3, 10, 30 мин, 1, 6 и 24 часа) животных выводили с эксперимента путем декапитации. Образцы ткани мозга замораживали и сохраняли в жидком азоте. Из исследуемых образцов получали гомогенаты. После центрифугирования в исследуемых пробах определяли уровень лактата, пирувата и соотношения свободных NAD/NADH пар.

Эксперименты на животных проведены в соответствии с Общими принципами работы на животных, одобренными 1-м Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, Украина, 2001) и согласованными с положением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, Франция, 1985).

Содержание лактата и пирувата определяли согласно методу, описанному в статье Bergmeyer H.U. [2]. В присутствии лактатдегидрогеназы (ЛДГ)

лактат превращается в пируват, причем связывание пирувата, образующегося в процессе реакции с гидразином, способствует полному окислению лактата:



Содержание лактата (в мкмоль на 1 г свежей ткани) рассчитывали согласно формуле:

$$C = \frac{\Delta E * \text{Разв.} * V_{\text{пробы}}}{6,22 * V_{\text{экстракта}}}, \text{ мкмоль лактата / г ткани}$$

где $\Delta E = E_{15} - E_0$ – разница экстинкции до и после реакции;

Разв. – Разведение экстракта на 1 г ткани;

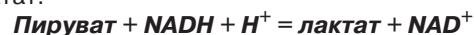
6,22 – коэффициент молярной экстинкции при

$\lambda = 340 \text{ нм}$;

$V_{\text{пробы}}$ – объем пробы в кювете (3,03 мл)

$V_{\text{экстракта}}$ – количество внесенного экстракта в пробу (0,3 мл).

В присутствии ЛДГ пируват превращается в лактат:



Равновесие реакции смещено вправо. При избытке NADH пируват быстро превращается в лактат. Количество пирувата эквивалентно количеству NADH, уменьшение которого регистрируется спектрофотометрически при длине волны 340 нм.

Содержание пирувата (в мкмоль на 1 г свежей ткани) рассчитывали согласно формуле:

$$C = \frac{\Delta E * \text{Разв.} * V_{\text{пробы}}}{6,22 * V_{\text{экстракта}}}, \text{ мкмоль пирувата / г ткани}$$

где $\Delta E = E_{15} - E_0$ – разница экстинкции до и после реакции;

Разв. – Разведение экстракта на 1 г ткани;

6,22 – коэффициент молярной экстинкции для

$\lambda = 340 \text{ нм}$;

$V_{\text{пробы}}$ – объем пробы в кювете (3,08 мл)

$V_{\text{экстракта}}$ – количество внесенного экстракта в пробу (2 мл).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью STATISTICA 10.0 с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Результаты предоставлены в виде среднего арифметического и его статистической погрешности ($M \pm m$). Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение.

В организме животных происходит поддержание состояния функциональной взаимосвязи между

биохимическими процессами, важную роль в котором играет редокс-состояние никотинамидных динуклеотидов. На основе соотношения NAD/NADH можно анализировать скорость течения и направление обратных реакций оксидоредукции и судить об участии этого соотношения в регуляции функционирования метаболических путей в клетке. Разобщение реакций гликолиза приводят к изменениям энергетического метаболизма, нарушению процессов тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, что приводит к снижению уровня АТФ и, как следствие, к различным энергодефицитным условиям [1,4]. При патологических и экстремальных состояниях происходит и изменение показателя свободных NAD/NADH пар.

В проведенном исследовании было установлено увеличение уровня лактата в ткани коры головного мозга крыс после введения тиопентала натрия. Статистически значимой разницы в разные сроки сравнения установлено не было. При этом на фоне высокого уровня лактата снижалась концентрация пирувата. Во временном отрезке 1-60 минут отмечены статистически значимые отличия в сравнении с контрольными показателями, а начиная с 6 часа опыта отмечалось постепенное восстановление изучаемого показателя (табл.). Во все временные отрезки был существенно снижен уровень свободных NAD/NADH пар. Изменение уровня NAD/NADH пар совпадал с соответствующей концентрацией пирувата.

Таблица.

Уровень лактата, пирувата и свободных NAD/NADH пар в ткани коры головного мозга крыс под действием тиопентала натрия (i.p., 30 мг/кг)

Время действия наркоза	Лактат	Пируват	NAD/NADH
контроль	2,05±0,15	0,084±0,023	370,57
30 секунд	6,43±0,07*	0,070±0,051	97,68*
1 минута	6,52±0,12*	0,016±0,004*	22,41*
3 минуты	6,51±0,23*	0,093±0,045	128,47*
10 минут	6,03±0,11*	0,056±0,035*	83,28*
30 минут	6,45±0,37*	0,133±0,004*	185,91*
60 минут	6,14±0,20*	0,046±0,039*	68,06*
6 часов	6,89±0,42*	0,073±0,045	96,03*
24 часа	7,01±0,31*	0,097±0,023	124,12*

Примечание: * – достоверно к показателю контрольной группы (p<0,05).

Повышение уровня лактата и пирувата свидетельствует о развитии дисбаланса в соотношении анаэробных и аэробных процессов энергообмена. Как известно, пируват образуется из глюкозы в процессе гликолиза. При этом синтезируется 2 молекулы АТФ (в цикле трикарбонных кислот образуется 32 молекулы АТФ). При патологических условиях уровень АТФ снижается вследствие активации АТФ-зависимых реакций и разобщения метаболических путей. Поэтому в анаэробных условиях гликолиза пируват превращается в лактата, что и объясняет

высокий уровень лактат в ткани мозга и длительный период его определения [6]. Не исключено, что закономерности образования и нейтрализации свободного лактата в ткани мозга реализуются с иной скоростью в сравнении с другими тканями, в частности мышечной. Увеличение содержания лактата в ткани мозга под действием тиопентала натрия также свидетельствует о подавлении гликолитического расщепления глюкозы аэробным путем и, как следствие, снижением образования молекул АТФ.

Поскольку для образования лактата необходим NAD, а при условиях повышенного содержания лактата происходит развитие лактат-ацидоза, то синхронно уровень пирувата снижается. От изменения соотношения NAD/NADH зависит анаэробный путь окисления глюкозы, где лактат является конечным продуктом гликолиза, или аэробного обмена, в котором лактат после преобразования в пируват окисляется в цикле трикарбонных кислот. В организме животных пируват является одним из центральных метаболитов, участвующих во многих ферментативных процессах. Увеличение содержания лактата по сравнению с пируватом в условиях тиопентал-натриевого наркоза свидетельствует об активации анаэробных процессов, а уменьшение – аэробных. Увеличение уровня пирувата (30 минут после введения тиопентала натрия) объясняет также механизм и нарушением функционирования цикла трикарбонных кислот в условиях барбитуровой анестезии.

Как известно, лактат образуется из пирувата в качестве конечного продукта анаэробного гликолиза. Эта окислительно-восстановительная реакция требует восстановленного никотинамидаденин-динуклеотида (NADH) и иона водорода (H⁺) и катализируется лактатдегидрогеназой (ЛДГ). Реакция выражается следующим уравнением:



Равновесие этой реакции способствует образованию лактата (нормальное соотношение лактата и пирувата – 10:1). Лактат в реакциях энергообмена представляет метаболический «тупик»: он не может утилизироваться в любых других внутриклеточных реакциях и должен вновь превратиться в пируват в реакциях глюконеогенеза или окислиться до CO₂ и H₂O в ходе реакций цикла Кребса. Результатом этой биохимической трансформации является продукция АТФ и окисление NADH в NAD. Следует отметить, что небольшое количество лактата образуется даже в состоянии покоя и в аэробных условиях, однако в присутствии кислорода и основных кофакторов лактат превращается в пируват. Таким образом, лактат не накапливается в качестве депонируемого конечного продукта и поддерживает равновесие с пируватом.

Этот биохимический процесс могут изменять различные факторы. Концентрация лактата в цитозоле зависит, прежде всего, от концентрации пирувата, внутриклеточного окислительно-восстановительного состояния (NADH/NAD) и внутриклеточного pH. Суммарный эффект этих и других факторов и определяет внутриклеточную концентрацию лактата в том числе и в условиях не только в состоянии общей анестезии, но и постнаркозического восстановления.

Поскольку лактат утилизируется преобразованием в молекулу пирувата, концентрация лактата тесно связана с последующей судьбой последнего. Пируват является ключевым промежуточным субстратом на пересечении нескольких путей метаболизма. Основным источником пирувата является процесс гликолиза, в ходе которого пируват образуется при окислении глюкозы, а также трансаминирования. В последнем случае пируват формируется при метаболизации аминокислот и, особенно, аланина. Пируват утилизируется в процессе глюконеогенеза, являясь субстратом для образования глюкозы, а также процесс окисления, при котором он поступает в митохондрии для окисления до CO_2 и H_2O . Нормальный ход этих реакций может изменяться под воздействием различных факторов. Так, быстрый гликолиз может быть вызван алкалозом, катаболическое состояние протеинов усиливает процесс трансаминирования, цитотоксические продукты метаболизма способны нарушить функцию митохондрий. В конечном итоге ключевые ферменты и кофакторы могут оказаться инактивированными или недоступными. Таким образом, концентрация пирувата и, следовательно, лактата зависит от суммарной продукции и потребления пирувата в ходе указанных различных реакций.

В настоящее время установлено, что внутриклеточное окислительно-восстановительное состояние является решающим фактором для изменения концентрации лактата. Доступность кислорода на тканевом уровне является важной детерминантой окислительно-восстановительного потенциала клеток. При длительно текущих анаэробных условиях лактат не может вновь окислиться до пирувата из-за дефицита NAD. В нормальных условиях возможно повторное окисление NADH до NAD в митохондриальной системе электронного транспорта, связанного с реакциями окислительного фосфорилирова-

ния. Однако при дефиците кислорода электронный транспорт сразу же прекращается. NAD становится недоступным для преобразования лактата, в результате чего лактат аккумулируется (лактат-ацидоза типа А). На окислительно-восстановительные реакции могут влиять и другие факторы. Следовательно, изменения в соотношении NADH/NAD не является единственным показателем тканевой оксигенации. Таким образом, молочнокислый ацидоз при тиопенталовом наркозе может рассматриваться как нарушение равновесия между скоростью продукции лактата и скоростью его утилизации в процессе глюконеогенеза, а также от исходного кислотно-щелочного статуса.

Выводы

В условиях тиопенталового наркоза установлено существенное замедление энергетических процессов в ткани мозга крыс. При этом происходила быстрая продукция лактата в первые минуты после введения общего анестетика барбитурата (тиопентала натрия) и развитие длительно текущего состояния лактат-ацидоза с утилизацией его предшественника – пирувата. Научная и клиническая значимость результатов исследования заключается в том, что обнаруженные закономерности подтверждают ряд известных биохимических аспектов действия средств для наркоза, дополняя новыми данными, относящимися к последовательному восстановлению метаболизма организма после выхода из состояния наркоза.

Перспективы дальнейших исследований

На основе полученных результатов можно определить ряд приоритетных направлений дальнейших исследований относящихся к биохимии и физиологии действия тиопентала натрия, в частности церебральной гемодинамики в условиях наркоза и способов коррекции выхода организма из данного состояния.

Литература

1. Торопова А.А. Влияние растительного средства «Полиноофит» на энергетический статус организма белых крыс в ранний постнаркозный период / А.А. Торопова, М.Ю. Итыгилов, Я.Г. Разуваева / Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2015. – № 2(102). – С. 95-98.
2. Bergmeyer H.U. Methods of enzymatic analysis / H.U. Bergmeyer. – New York, 1963. – 1064 p.
3. Caines D.E. Comparison of isoflurane and propofol maintenance anesthesia and evaluation of cerebrospinal fluid lactate and plasma lactate concentrations for dogs with intracranial disease undergoing magnetic resonance imaging / D.E. Caines. – Guelph, Ontario, Canada, 2012. – 166 p.
4. Changes in myocardial lactate, pyruvate and lactate-pyruvate ratio during cardiopulmonary bypass for elective adult cardiac surgery: Early indicator of morbidity / P.M. Kapoor, B. Mandal, U.K. Chowdhury [et al.] // J. Anaesthesiol Clin. Pharmacol. – 2011. – Vol. 27, № 2. – P. 225–232.
5. Dewhirst E. Perioperative care of an infant with pyruvate dehydrogenase deficiency, Southern African / E. Dewhirst, S. Rehman, J.D. Tobias // Journal of Anaesthesia and Analgesia. – 2012. – Vol. 18, № 2. – P. 115-118.
6. Diemel G.A. Brain lactate metabolism: The discoveries and the controversies / G.A. Diemel // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2012. – Vol. 32, № 7. – P. 1107-1138.
7. The effects of propofol and thiopental continuous infusion on serum potassium disturbances in neurosurgical patients / Tae Kyong Kim, Young-Jin Lim, Jae-Woo Ju [et al.] // J. Korean Neurosurg. Soc. – 2015. – Vol. 57, № 3. – P. 197-203.

УДК 615.011

ВПЛИВ ТІОПЕНТАЛ НАТРІЮ НА СТАН ЕНЕРГЕТИЧНОГО ОБМІНУ В ГОЛОВНОМУ МОЗКУ

Макаренко О. М., Савосько С. І.

Резюме. У статті досліджували вплив тіопенталу-натрієвого наркозу на біохімічні показники енергообміну у тканині мозку щурів на різних термінах після застосування загальної анестезії. За умов наркозу встановлено різку гіперпродукцію лактату в перші хвилини після введення тіопенталу натрію і розвиток тривалого лактат-ацидозу, падіння рівня пірувату і NAD/NADH пар. Відновлення енергетичного обміну тканини мозку

при наркозі було тривалим і проявлялось відновленням рівня пірувату лише через 6 годин після введення тиопенталу натрію. Результати досліджень розширюють відомі біохімічні аспекти дії наркозного засобу і доповнюються новими даними щодо відновлення організму після виходу зі стану наркозу.

Ключові слова: тиопенталу натрію, лактат, піруват, енергообмін.

УДК 615.011

ВЛИЯНИЕ ТИОПЕНТАЛА НАТРИЯ НА СОСТОЯНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ

Макаренко А. Н., Савосько С. И.

Резюме. В статье исследовали влияние тиопентал-натриевого наркоза на биохимические показатели энергообмена в ткани мозга крыс на разных сроках после применения общей анестезии. В условиях наркоза установлено резкую гиперпродукцию лактата в первые минуты после введения тиопентала натрия и развитие длительного лактат-ацидоза, падение уровня пирувата и NAD/NADH пар. Восстановление энергетического обмена ткани мозга при наркозе было длительным и проявлялось восстановлением уровня пирувата лишь через 6 часов после введения тиопентала натрия. Результаты исследований расширяют известные биохимические аспекты действия наркозного средства и дополняются новыми данными о восстановлении организма после выхода из состояния премедикации/наркоза.

Ключевые слова: тиопентала натрия, лактат, пируват, энергообмен.

UDC 615.011

INFLUENCE OF THIOPENTAL SODIUM ON ENERGY METABOLISM IN THE BRAIN

Makarenko A. N., Savosko S. I.

Abstract. The paper investigated the effects of anesthesia on the biochemical parameters of energy state in the brain tissue of rats at different time period after injection of sodium thiopental.

The study was carried out on 45 male albino rats (body wt 225±10 g). Sodium thiopental was injected intraperitoneally (i.p.) at a dose of 30 mg/kg. After a certain time period (30 seconds; 1, 3, 10, 30 minutes; 1, 6 and 24 hours) experimental animals were decapitated. The samples of brain tissue were frozen and stored in liquid nitrogen. Tissue homogenates were prepared and centrifuged, in the supernatants were determined the level of lactate, pyruvate, and the ratio of free NAD/NADH couples.

The biochemical studies were established a 3-fold increased lactate level in the brain tissue of rats after injection of sodium thiopental ($p < 0,01$). Statistically significant differences between the time periods (30 seconds – 24 hours) have been not established. Against the high level of lactate we have set decrease pyruvate concentration. In time interval within 1-60 minutes was indicate statistically significant differences with control group, and in time interval within 6-24 hours gradual recovery of the studied index. At all time points were significantly reduced level of free NAD/NADH couples. The changed level of NAD/NADH couples was coincided with the corresponding concentration of pyruvate.

The increased lactate level comparison to pyruvate concentration indicates about activation of anaerobic processes, and reduction – aerobic. Increasing the pyruvate level (30 minutes after injection of sodium thiopental) can be explained by disruption of tricarboxylic acid cycle (*Krebs cycle*). Increased both lactate and pyruvate levels are evidence about imbalance in anaerobic and aerobic energy processes. At long current anaerobic conditions lactate can't be re-oxidized to pyruvate through prolonged NAD deficit. It is not excluded that the pattern formation and neutralization of free lactate in the brain tissue are realized at a different rate as compared with other tissues, particularly muscle. The increased lactate level in the brain tissue by sodium thiopental may also be a sing of suppressing glycolytic glucose cleavage and, consequently, reduced ATP production.

Thus, under thiopental anesthesia we found significant deceleration of energy processes in the brain tissue of rats. There is a rapid production of lactate in the first minutes after injection of sodium thiopental and prolonged state of lactic acidosis with its predecessor utilization – pyruvate. Scientific and clinical significance results of this study concluded that the received laws confirm a numerous biochemical aspects of anesthetic action and complemented with new data relating to the recovery of the body after the state of anesthesia.

Keywords: sodium thiopental, lactate, pyruvate, energy exchange.

Рецензент – проф. Костенко В. О.
Стаття надійшла 10.03.2016 року