

## ЛУЧШАЯ РАБОТА В ОБЛАСТИ КЛИНИЧЕСКОЙ ТОКСИКОЛОГИИ

УДК 57.021:577.1

# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ И АПОПТОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В РЕАЛИЗАЦИИ ОТДАЛЕННЫХ ПОСЛЕДСТВИЙ ОСТРОГО ТЯЖЕЛОГО ОТРАВЛЕНИЯ ТИОПЕНТАЛОМ НАТРИЯ

Т.А. Кострова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», 192019, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

**Б**ыло проведено экспериментальное исследование по изучению влияния отдаленных последствий острых отравлений нейротоксикантами на изменения концентрации нейротрофических факторов и факторов апоптоза у лабораторных животных. Острое отравление тиопенталом натрия моделировали однократным введением в дозе 85 мг/кг массы животного внутривенно. Через 1 месяц после отравления выжившие животные были подвергнуты эвтаназии для отбора биологического материала. Исследовались изменения концентрации нейротрофических маркеров: MBP, NSE, BDNF и PEDF в сыворотке крови лабораторных животных методом ИФА и апоптотические факторы в тканях головного мозга: каспаза 3, каспаза 9 и белок p53 методом иммуногистохимии. Полученные результаты показали нарушение гомеостаза нейротрофических факторов головного мозга, исследованных в сыворотке крови, а также индукцию апоптотических реакций, исследованных в тканях головного мозга лабораторных крыс. Данные изменения являются одним из патогенетических звеньев механизма поражения нервной системы, которое может проявляться в нарушении высшей нервной деятельности, в том числе изменении поведенческих реакций и когнитивных функций.

**Ключевые слова:** нейротоксиканты, нейротрофические факторы, факторы апоптоза, интоксикация, тиопентал натрия.

**Введение.** В картине острых отравлений первое место занимают интоксикации веществами, вызывающими первичное поражение головного мозга. В России острые тяжелые отравления депримирующими агентами составляют более половины от всех, поступающих в токсикологические центры [1]. По исследованной литературе, при бытовых отравлениях, составляющих подавляющее большинство, поражения центральной нервной системы, возникающие в отдаленном периоде после острой тяжелой интоксикации, не связываются с ней. Поэтому данные статистики о последствиях острых тяжелых отравлений нейротоксикантами отсутствуют [2]. В токсикологии недостаточно внимания уделяется вопросу

отдаленных последствий острых тяжелых отравлений нейротоксикантами для нервной системы. Между тем эта проблема не может считаться решенной. Неуклонно растет число неврологических нарушений по типу астенического синдрома, энцефалопатии и органических нарушений. Найденные в литературе данные описания клинических вариантов астенического синдрома и синдрома органического поражения головного мозга можно считать лишь феноменологической оценкой, не позволяющей достаточно эффективно планировать возможные направления фармакологической коррекции данных нарушений [3].

Известно, что увеличение образования активных форм кислорода вызывает нарушение вну-

триклеточного гомеостаза и запускает индукцию митохондриального сигнального пути апоптоза клеток [4, 5]. В проведенных ранее исследованиях получены данные, что после острых тяжелых отравлений было выявлено нарушение гомеостаза нейротрофических маркеров, таких, как нейронспецифическая енолаза (NSE), основной белок миелина (MBP), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) и пигментный фактор эпителиального происхождения (PEDF). Нейронспецифическая енолаза (NSE) является ферментом гликолиза в тканях головного мозга и изменение ее концентрации свидетельствует о нарушении энергетики в клетках тканей ЦНС [6]. Основным белком миелина (MBP) является маркером разрушения миелиновых оболочек в нервной ткани [7]. Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), который защищает нейроны головного мозга от ишемических атак и мотонейроны от гибели, индуцируемой удалением аксонов, повышается при коматозном состоянии, которое сопровождается гипоксией [8]. Пигментный фактор эпителиального происхождения (PEDF) - нейропротективный и нейротрофический фактор, который воздействует на различные типы нейронов [9]. Изучение факторов апоптоза в предыдущих экспериментальных работах показало, что тиопентал натрия индуцировал экспрессию маркеров апоптоза каспазу 9, каспазу 3, белки p53 и bcl-2 в нервной ткани головного мозга крыс (разных зонах коры и гиппокампа). Также прослеживалась определенная закономерность между повышением активности ингибитора апоптоза белка bcl-2 и снижением активности каспаз, что соответствует сложившимся на настоящее время научным представлениям о протекании данного процесса [10].

*Целью исследования* явилось комплексное изучение изменений концентрации нейроспецифических и апоптотических маркеров в отдаленном периоде после острого тяжелого отравления тиопенталом натрия.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- исследовать нейроспецифические показатели в сыворотке крови в отдаленном периоде после острых тяжелых отравлений тиопенталом натрия;

- исследовать апоптотические факторы в тканях головного мозга в отдаленном периоде после острых тяжелых отравлений тиопенталом натрия.

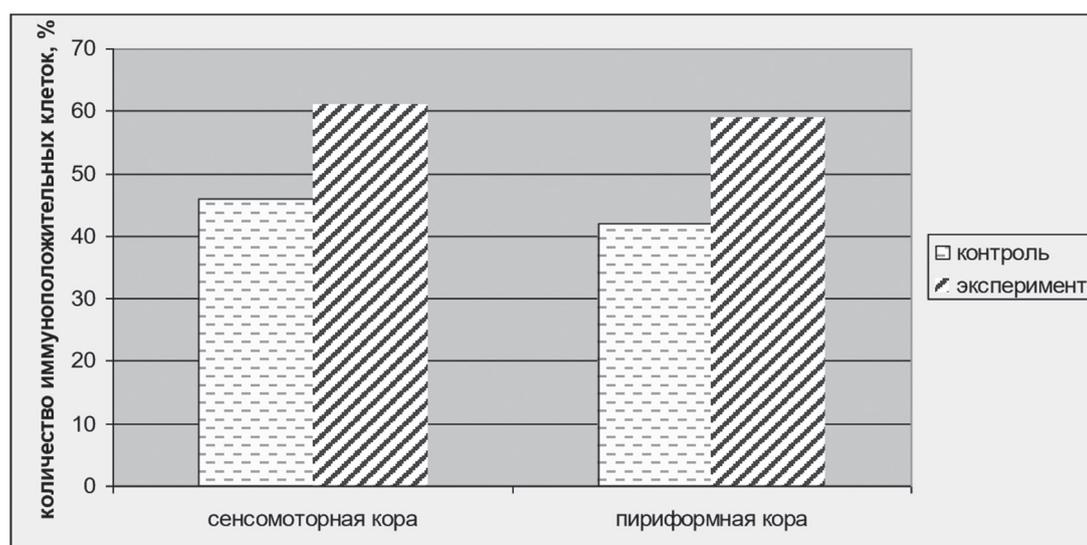
**Материалы и методы исследования.** Исследование проводилось на 30 белых беспородных крысах-самцах 180-220 г. Животные содержались в соответствии с требованиями ГОСТ 33044-2014 от 01.08.2015 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Животные были разделены на 2 группы: первая группа – контрольная, вторая – экспериментальная. Острое тяжелое отравление тиопенталом натрия моделировали однократным введением в дозе 85 мг/кг массы животного внутривенно [11]. Контрольным животным, в те же сроки внутривенно вводили физиологический раствор в дозе 1,0 мл/кг массы. Через 1 месяц после отравления выжившие животные были подвергнуты эвтаназии для отбора биологического материала. Исследовались изменения концентрации нейротрофических маркеров: MBP, NSE, BDNF и PEDF в сыворотке крови лабораторных животных методом ИФА. Для исследования апоптотических факторов в тканях головного мозга использовали первичные антитела к каспазе 3 (Rb pAb to active Caspase 3 (Abcam))

Таблица 1

**Изменение концентрации показателей биохимических маркеров нейротоксичности в сыворотке крови лабораторных животных через 1 месяц после острого тяжелого отравления тиопенталом натрия**

| Исследуемые показатели (M±m)                                 | Экспериментальные группы |                    |
|--|--------------------------|--------------------|
|  | Контроль (N=10)          | Эксперимент (N=10) |
| Нейронспецифическая енолаза (NSE), нг/мл                     | 17038,2±927,5            | 12424,8±826,6*     |
| Основной белок миелина (MBP), нг/мл                          | 5,50±0,47                | 15,25±3,12*        |
| Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), пг/мл        | 472,1±44,5               | 570,3±75,9         |
| Пигментный фактор эпителиального происхождения (PEDF), нг/мл | 225,3±12,7               | 259,1±6,0*         |

\* - Различия достоверны по сравнению с контролем (при p ≤ 0,05; критерий Манна-Уитни)



**Рис. 1.** Количество иммуноположительных к каспазе-9 клеток в структурах мозга через 1 месяц после воздействия тиопенталом натрия

и каспазе 9 (Rb mAb to Caspase 9 (Abcam)), белку p53 (p53 (C-19) goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology) и bcl-2 (bcl-2 (C-21) rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology). Препараты анализировали с помощью светового микроскопа Микромед 3, совмещенного с CCD камерой, съемку и сохранение изображений осуществляли с использованием программы WebCam Companion.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel. Вычисляли средние значения и стандартную ошибку ( $M \pm m$ ) с использованием U-критерия Манна-Уитни при уровне значимости 0,05.

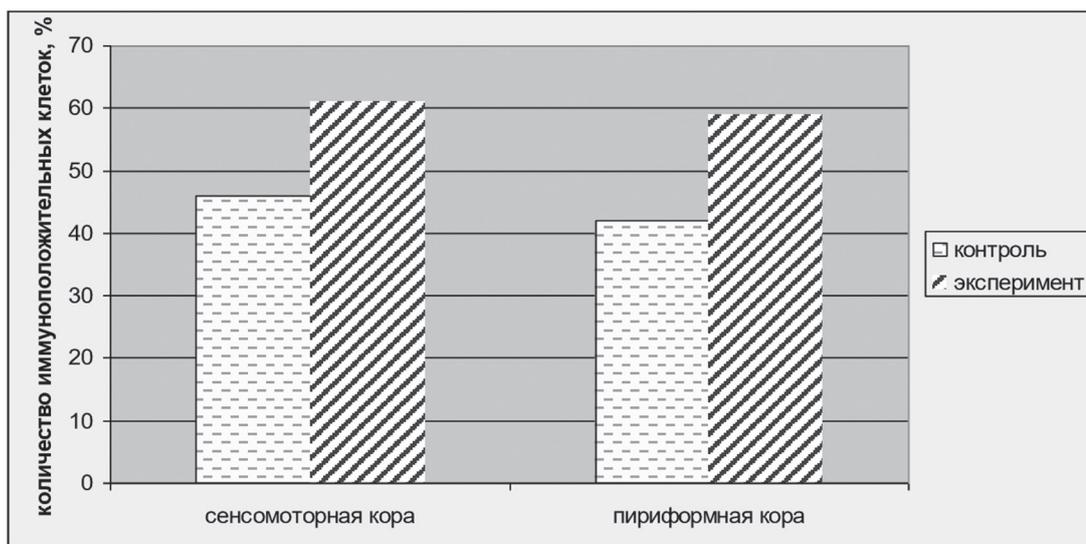
**Результаты и обсуждение.** В результате исследования показателей нейроспецифических белков у животных, перенесших острое тяжелое отравление, через 1 месяц после интоксикации зарегистрировано достоверное увеличение концентрации основного белка миелина (MBP) в 2,7 раза в группе животных после острого тяжелого отравления тиопенталом натрия по сравнению с контрольной группой (табл. 1).

Основной белок миелина является маркером разрушения миелиновых оболочек, его повышение связывают с демиелинизацией в клетках тканей головного мозга [7]. Также отмечалось снижение концентрации нейронспецифической енолазы (NSE) на 27,0% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой. NSE используется в качестве маркера нарушения нейронального гликолиза [12], его снижение свидетельствует об угнетении энергетики в тканях головного мозга. При этом концентрация белка PEDF в экспериментальной группе животных после отравления тиопенталом натрия достоверно повышалась на

15,0% по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы. Белок PEDF способен предотвращать апоптотическую гибель клеток нейронов под действием перекисей [9]. Полученное увеличение концентрации PEDF через 1 месяц после интоксикации свидетельствует о компенсаторной реакции нервных клеток на наличие патологического процесса в тканях центральной нервной системы.

В результате иммуногистохимического исследования через 1 месяц после острого тяжелого отравления тиопенталом натрия на исследуемых срезах мозга выявлено развитие иммуноположительной реакции при использовании маркеров апоптоза – наблюдалась достоверное увеличение количества каспаза-9 положительных клеток в сенсомоторной и пириформной коре и достоверное увеличение количества каспаза-3 положительных клеток в ретроспленальной и сенсомоторной коре (рис. 1, 2). Следует отметить, что в сенсомоторной коре количество каспаза-3 положительных клеток выявлено преимущественно в нижнем слое. В зубчатой извилине гиппокампа иммуноположительную реакцию проявляли только единичные клетки, что значительно не отличалось от контроля. Белок bcl-2 экспрессировался локально в отдельных зонах ретроспленальной коры (гранулярный и дисгранулярный слой), но достоверно не отличался от показателей контрольной группы. В нейронах сенсомоторной зоны коры регистрировалась высокая активность данного белка, достоверно не отличавшаяся контрольной группы.

Увеличение в различных структурах головного мозга клеток с повышенной экспрессией каспаз-3 и -9, которые являются центральным



Количество иммуноположительных к каспазе-3 клеток в структурах мозга через 1 месяц после воздействия тиопенталом натрия

звеном в механизме апоптоза свидетельствует об ускорении клеточной гибели, продолжающейся через 1 месяц после острого отравления тиопенталом натрия в тканях головного мозга. Данный факт подтверждается также отсутствием увеличения экспрессии белка bcl-2, который является антиапоптотическим и подавляет апоптоз во многих клеточных системах, регулирует клеточную гибель и ингибирует каспазы [10].

**Заключение.** Молекулярно-клеточные изменения в отдаленном периоде после острых тяжелых

отравлений нейротоксикантами характеризуются нарушением гомеостаза нейротрофических факторов головного мозга, а также увеличением количества каспазы 3, 9 положительных клеток в различных структурах головного мозга, что свидетельствуют об ускоренной гибели клеток в тканях ЦНС [10]. Данные изменения являются одним из патогенетических звеньев механизма поражения центральной нервной системы, которое может проявляться в нарушении высшей нервной деятельности, в том числе изменении поведенческих реакций и когнитивных функций [13].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тарасова Ф.В., Почтарева Е.С., Пилишенко В.А., Куркин Д.М., Глушкова Н.Ю. Динамика и структура острых отравлений химической этиологии в Московской области за 2011-2013 гг. Москва: Роспотребнадзор; 2014: 4.
2. Горский А.А., Почтарева Е.С., Пилишенко В.А., Куркин Д.М., Глушкова Н.Ю. О состоянии условий труда и профессиональной заболеваемости работников в Российской Федерации. Здоровье населения и среда обитания. 2014; 2: 8-11.
3. Шилов В.В., Александров М.В., Васильев С.А. Коррекция мнестико-интеллектуальных нарушений в соматогенной стадии острых отравлений смесью психотропных препаратов. Фармакотерапия. 2012; 3: 63-65.
4. 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.
5. Батоцыренова Е.Г., Кашуро В.А., Минаева Л.В., Швецов А., Степанов С.В., Лапина Н.В., Бонитенко Е.Ю. 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.
6. Кашуро В.А., Батоцыренова Е.Г., Елаева Н.Л., Савенко Ю.Н., Лапина Н.В., Аксёнов В.В. Динамика содержания нейротрофических факторов головного мозга при экспериментальной коме у крыс. Казанский медицинский журнал. 2013; 94(5): 695-699.
7. Чехонин В.П., Гурина О.И., Дмитриева Т.Б. Основной белок миелина. Строение, свойства, функции, роль в диагностике демиелинизирующих заболеваний. Биомедицинская химия. 2000; 46(6): 549-563.
8. Lima Giacobbo B, Doorduyn J, Klein HC, Dierckx RAJO, Bromberg E, de Vries EFJ. Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. Molecular neurobiology. 2019; 56(5): 3295-3312.
9. Chen T, Li T, Wang J. p53 mediates PEDF-induced autophagy in human umbilical vein endothelial cells through sestrin2 signaling. Molecular medicine reports. 2019; 20(2):1443-1450.
10. Швецов А.В., Дюжикова 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.
11. Башарин В.А., Гребенюк А.Н., Бонитенко Е.Ю., Иванов М.Б., Макарова Н.В. Экспериментальная модель барбитуратной комы Токсикологический вестник. 2010; 4 (103): 21-25.
12. Firat Oğuz E, Yılmaz FM, Tutkun E, Yılmaz ÖH, Ercan M, Sezer S. Serum S100B, NSE, and GRIA1 levels as neurological biomarkers in lead exposure. Turkish journal of medical sciences. 2018; 14; 48(3): 449-454.
13. Кострова Т.А., Лисицкий Д.С., Батоцыренова Е.Г., Кашуро В.А. Исследование сочетанного действия тиопентала натрия и нарушения циркадианных ритмов на поведенческие реакции лабораторных животных. Medline.ru. Российский биомедицинский журнал. 2018; 19: 167-181.

## REFERENCES:

1. Tarasova F.V., Pochtareva E.S., Pilishenko V.A., Kurkin D.M., Glushkova N.Yu. Dynamics and structure of acute poisoning using etiology in the Moscow region for 2011-2013 Moscow: Rosпотребнадзор; 2014: 4. (in Russian)
2. Gorsky A.A., Pochtareva E.S., Pilishenko V.A., Kurkin D.M., Glushkova N.Yu. On the state of working conditions and occupational morbidity of workers in the Russian Federation. Public health and habitat. 2014; 2: 8-11. (in Russian)
3. Shilov V.V., Aleksandrov M.V., Vasiliev S.A. Correction of mnesitic-intellectual disorders in the somatogenic stage of acute poisoning with a mixture of psychotropic drugs. Pharmacotherapy. 2012; 3: 63-65. (in Russian)
4. Kashuro V.A., Dolgo-Saburov V.B., Dagayev S.G., Batotsyrenova E.G., Kubarskaya L.G., Aksenov V.V. Study of the role of the antioxidant system and lipid peroxidation in the pathogenesis of thiopental coma. Chemical and biological

- safety. 2012; S: 3-7. (in Russian)
5. Batotsyrenova E.G., Kashuro V.A., Minaeva L.V., Shvetsov A.V., Stepanov S.V., Lapina N.V., Bonitenko E.Yu. The signal function of reactive oxygen species when intoxicated with sodium thiopental. Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. Social, humanitarian, biomedical sciences. 2014; 16 (5-4): 1376-1379. (in Russian)
6. Kashuro V.A., Batotsyrenova E.G., Elaeva N.L., Savenko Yu.N., Lapina N.V., Aksyonov V.V. Dynamics of the content of neurotrophic brain factors in experimental coma in rats. Kazan Medical Journal. 2013; 94 (5): 695-699. (in Russian)
7. Chekhonin V.P., Gurina O.I., Dmitrieva T.B. The main protein is myelin. Structure, properties, functions, role in the diagnosis of demyelinating diseases. Bio-medical chemistry. 2000; 46 (6): 549-563. (in Russian)
8. Lima Giacobbo B, Doorduyn J, Klein HC, Dierckx RAJO, Bromberg E, de Vries EFJ. Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. Molecular neurobiology. 2019; 56(5): 3295-3312.
9. Chen T, Li T, Wang J. p53 mediates PEDF-induced autophagy in human umbilical vein endothelial cells through sestrin2 signaling. Molecular medicine reports. 2019; 20(2):1443-1450.
10. Shvetsov A.V., Dyuzhikova N.A., Savenko Yu.N., Batotsyrenova E.G., Kashuro V.A. The effect of experimental coma on bcl-2 and caspase-3.9 protein expression in rat brain. Bulletin of experimental biology and medicine. 2015; 160 (8): 178-181. (in Russian)
11. Basharin V.A., Grebenyuk A.N., Bonitenko E.Yu., Ivanov M.B., Makarova N.V. An experimental model of barbiturate coma Toxicological Bulletin. 2010; 4 (103): 21-25. (in Russian)
12. Firat Oğuz E, Yılmaz FM, Tutkun E, Yılmaz ÖH, Ercan M, Sezer S. Serum S100B, NSE, and GRIA1 levels as neurological biomarkers in lead exposure. Turkish journal of medical sciences. 2018; 14; 48(3): 449-454.
13. Kostrova T.A., Lissitsky D.S., Batotsyrenova E.G., Kashuro V.A. Investigation of the combined effect of sodium thiopental and circadian rhythm disorders on the behavioral responses of laboratory animals. Medline.ru. Russian Biomedical Journal. 2018; 19: 167-181. (in Russian)

T.A. Kostrova

### EXPERIMENTAL EVALUATION OF CHANGES IN NEUROTROPHIC AND APOPTOTIC FACTORS IN THE IMPLEMENTATION OF LONG-TERM CONSEQUENCES OF ACUTE SEVERE POISONING BY SODIUM THIOPENTAL

Institute of Toxicology of the Federal Medical-Biological Agency, 192019, Saint Petersburg, Russian Federation

The influence of long-term effects of acute poisoning by neurotoxicants on changes in the concentration of neurotrophic factors and factors of apoptosis in laboratory animals has been experimentally investigated. Acute sodium thiopental poisoning was modeled by a single intraperitoneal injection at a dose of 85 mg / kg. In one month after the poisoning the surviving animals were euthanized to select biological material. Changes in concentration of neurotrophic markers: MBP, NSE, BDNF and PEDF in blood serum of laboratory animals and apoptotic factors in brain tissues: caspase 3, caspase 9 and protein p53 have been estimated by ELISA and immunohistochemistry, respectively. The results showed impaired homeostasis of brain neurotrophic factors studied in serum, as well as induction of apoptotic reactions studied in brain tissues of laboratory rats. These changes are one of the pathogenetic links of the mechanism of damage to the nervous system, which can be manifested in violation of higher nervous activity, including changes in behavioral reactions and cognitive functions.

**Keywords:** neurotoxicants, neurotrophic factors, apoptosis factors, intoxication, sodium thiopental.

Переработанный материал поступил в редакцию 19.09.2019 г.

