

STUDII EXPERIMENTALE PRIVIND ACȚIUNEA ISOFLURANULUI ȘI HALOTANULUI ASUPRA PEROXIDAZEI

C. Șeitan*, Mihaela Pop*, G. Coman*, Nicoleta Taus**

REZUMAT

Isofluranul se apropie foarte mult de calitățile agentului anestezic ideal, datorită manevrabilității sale, cu un control bun al profunzimii anestezice, datorită stabilității hemodinamice pe care o conferă și datorită bunei protecții neuronale pe care o dă.

În lucrarea de față studiile experimentale urmăresc influența isofluranului și halotanului asupra unui sistem enzimatic 3,3'-diaminobenzidina - apă oxigenată - peroxidaza. S-a demonstrat acțiunea inhibitoare a halotanului și acțiunea activatoare a isofluranului. Aceste modificări ale vitezelor de reacție și respectiv ale activității enzimei au permis prelucrări matematice statistice și posibile explicații ale mecanismelor de acțiune ale isofluranului și halotanului.

Cuvinte cheie: anestezice generale, isofluran, halotan, peroxidaza, 3,3' diaminobenzidină.

ABSTRACT

Experimental study on isofluran and halotan on peroxidase activity

Isoflurane has the same qualities with these of its own use, with a good control of the depth of the anesthesiology, because of the persistence of the cardiovascular system and because of a good protection for the nervous system.

In this work the experimental researches study the influence of the isoflurane and of the halothane on the enzymatic system peroxidase - 3,3' diamino benzidine-hydrogen peroxide.

They demonstrated the inhibitive action of the halothane and the activating agent of the isoflurane.

These modifications of the reaction speed and of the enzyme activity allowed statistical mathematical analyses and some explanation of the activity of the isoflurane.

Key words: general anesthetics, isofluran, halotan, peroxidase - 3,3' diamino benzidine.

Aspecte generale

Anestezicele sunt substanțe care, la doze terapeutice, sunt capabile să suprimă sau să diminueze temporar sensibilitatea organismului fără a afecta funcțiile vitale.

Isofluranul și halotanul sunt anestezice ce produc inducerea rapidă a anesteziei. Deprimarea zonelor respective din sistemul nervos central este direct proporțională cu concentrația anezicelor în sânge și în țesut. În **tabelul I** sunt prezentate concentrațiile halotanului în sânge pentru diverse intervenții:

Tabelul I **Concentrațiile halotanului în sânge pentru diverse intervenții chirurgicale**

Tipul intervenției	Concentrația halotanului în sânge (mg %)
intervenții de suprafață	7 - 8
intervenții chirurgicale	12
deprimarea centrului respirator	30 - 38

În prezentul studiu experimental s-a analizat influența isofluranului și halotanului asupra unui sistem peroxidazic. S-a încercat o posibilă explicație a acțiunii acestor anestezice asupra peroxidazei și a H_2O_2 din organismele supuse diverselor intervenții.

În sistemul 3,3' - diaminobenzidină - apă oxigenată - peroxidază s-au introdus concentrații cunoscute de isofluran

și respectiv de halotan, urmărindu-se fotometric cinetica reacției enzimice.

S-au analizat și s-au validat statistic dependențele vitezelor de reacție și respectiv ale activităților enzimice în funcție de concentrațiile anezicelor analizate.

Au fost respectate condițiile necesare întocmirii unui dosar de validare statistică. Astfel, s-au descris modul de lucru al metodei utilizate, rezultatele experimentale, precum și analizele statistice ale acestor rezultate. Obținerea rezultatelor finale și interpretarea acestora s-a realizat într-o manieră critică obiectivă.

Substanțele și aparatura

Substanțele utilizate în prezentul studiu:

- 3,3' - diaminobenzidina - Fluka (Buchs, Elveția)
- apă oxigenată - Alfa (Karlsruhe, Germania)
- peroxidază - Merk (Darmstadt, Germania)
- isofluran - soluție comercială Forine, Abbott (Cedex, Franța)
- halotan - soluție comercială Narcotan (halotan stabilizat cu 0,01% timol), Leciva (Praga, Rep. Cehia)
- soluție tampon fosfat salin (PBS) - Ortho Diagnostic System Inc. (New Jersey, SUA)

Soluția PBS a fost utilizată pentru a menține pH-ul optim de acțiune pentru peroxidază, pH = 7,4.

Determinările s-au realizat la temperatura camerei.

Formarea în timp a produsului reacției enzimice s-a

* Dr. Cătălin Șeitan, Mihaela Pop - asistent, Dr. Gheorghe Coman, conferențiar - Disciplina de Biochimie a Facultății de Medicină Universitatea Transilvania Brașov

** Dr. Nicoleta Taus, asistent Disciplina de Farmacologie a Universității Transilvania Brașov

urmărit utilizând un fotometru Eppendorf, selecționându-se radiații cu ajutorul unui filtru colorat ($\lambda = 492 \text{ nm}$).

Modul de lucru

Modul de lucru cuprinde următoarele etape:

● S-au preparat soluțiile reactivilor utilizați în studiul experimental, ținând cont de ipotezele de staționaritate ale cineticilor enzimice de tipul:



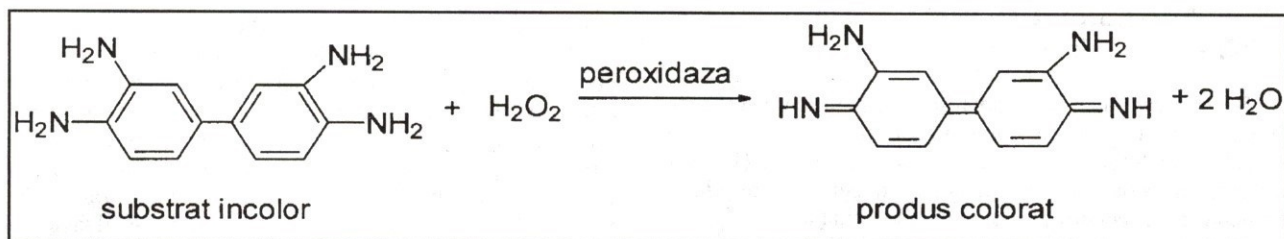
unde:

E - reprezintă enzima ce catalizează procesul

S - substratul specific enzimei

ES - complexul intermediar enzimă - substrat

P - produsul de reacție



S-au determinat densitățile optice (O.D.) ale produsului de reacție format la intervale de 15 s. S-au prelucrat statistic valorile densităților optice în primele secunde ale reacției enzimice, deoarece procesul a prezentat o viteză mare a reacției.

Rezultate. Discuții.

Analizând datele obținute experimental s-au obținut valori mici ale deviațiilor standard, ale dispersiilor și erorilor standard ale mediei, ceea ce indică faptul că experimentul s-a desfășurat cu erori foarte mici.

Ținând cont și de celelalte valori experimentale ale densităților optice în timp, pentru diferite concentrații de isofluran și halotan, s-au realizat reprezentările grafice OD = f(timp). Pentru fiecare probă analizată statistic s-a observat respectarea formei teoretice a curbei Michaelis-Menten. S-a remarcat o porțiune liniară care corespunde unei ecuații de ordinul I, urmată de o zonă cu ordin fracționar și apoi saturare, caracteristică vitezei maxime de reacție. Pentru fiecare probă s-a realizat liniarizarea porțiunii corespunzătoare primelor secunde ale reacției, utilizând un program computerizat ce utilizează metodele celor mai mici pătrate. Acest program furnizează ecuația dreptei de regresie, alături de deviația maximă (max. dev.) și coeficientul de corelație (r^2) (Tabelul II).

S-au observat valori mici ale deviațiilor maxime și valori ale coeficienților de corelație apropiate de valoarea unitară. Acești parametri indică alegerea corectă a dependenței direct proporționale între cele două mărimi experimentale.

Panta porțiunii liniare reprezintă de fapt viteza procesului enzimatic. S-a reprezentat grafic dependența vitezei de reacție în funcție de concentrația de isofluran și respectiv de halotan din sistem (Fig. 1).

Pentru a caracteriza afinitatea (eficiența) enzimei față de un substrat dat se consideră viteza de formare a produsului P, în următoarele condiții (asemănătoare celor din sistemele enzimice ale organismelor).

Ținând cont de valorile concentrației de halotan în sânge în diverse intervenții (Tabel I) s-au realizat diluări ale produselor comerciale Narcotan și Forine, pentru a se încadra în domeniul de concentrații 7 - 38 mg/100 ml probă.

S-au menținut constante concentrația enzimei ($8 \cdot 10^9 \text{ M}$) și concentrația substratului (0,841 mM), variindu-se concentrațiile de anestezic din sistem.

Pentru fiecare dintre concentrațiile agenților anestezici s-au realizat 3 - 5 determinări care au fost prelucrate statistic în vederea calculării vitezelor de reacție și respectiv a activităților enzimice.

În urma reacției enzimice s-a obținut un produs chinoidic brun, care prezintă maxim de absorbție la 475 nm. Cinetica formării produsului de reacție s-a urmărit fotometric la $\lambda = 492 \text{ nm}$ (în apropierea absorbției maxime a acestuia).

Tabel II Ecuațiile dreptelor de regresie OD = f(timp) la diferite concentrații de isofluran

Proba	[isofluran] mg/100ml proba	Ecuația dreptei de regresie	max dev	r^2
0	0	OD=0,0119*timp+0,0102	0,0263	0,988
A	5	OD=0,0126*timp+0,0118	0,0388	0,984
B	7,5	OD=0,0129*timp+0,0105	0,260	0,990
C	10	OD=0,0133*timp+0,0112	0,0343	0,989
D	20	OD=0,0133*timp+0,0144	0,0462	0,979
E	25	OD=0,0132*timp+0,0123	0,0585	0,977
F	30	OD=0,0133*timp+0,0127	0,0415	0,981
G	35	OD=0,0132*timp+0,0139	0,0278	0,985

Tabel III Ecuațiile dreptelor de regresie OD = f(timp) pentru diferite concentrații ale halotanului

Proba	[halotan] mg/100ml proba	Ecuația dreptei de regresie	max dev	r^2
0	0	OD=0,0119*timp+0,0102	0,0263	0,988
A	5	OD=0,0116*timp+0,0143	0,0417	0,976
C	12,5	OD=0,0114*timp+0,0114	0,0328	0,983
D	17,5	OD=0,0107*timp+0,0147	0,0344	0,974
E	20	OD=0,0105*timp+0,0131	0,0500	0,966
F	25	OD=0,00979*timp+0,0123	0,0558	0,953
G	30	OD=0,00950*timp+0,0108	0,0267	0,981
H	35	OD=0,00928*timp+0,0972	0,0231	0,983

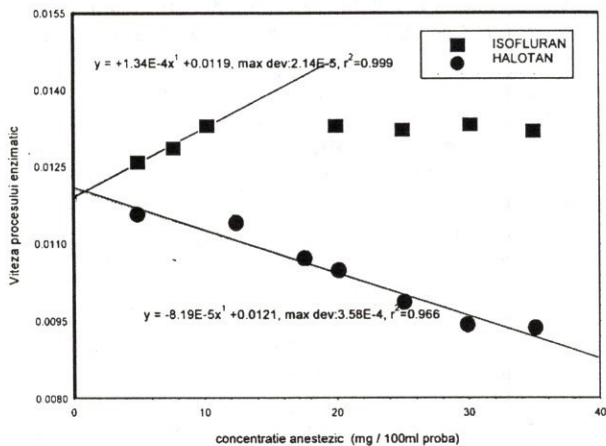


Fig. 1. Variația vitezei reacției enzimatice în prezența isofluranului și a halotanului

$[E] = 8 \cdot 10^{-9} \text{ M}; [S] = 0,841 \text{ mM}.$

S-a observat o creștere a vitezei reacției pe intervalul de concentrație (0 - 10) mg isofluran/100 ml probă, urmată de un palier al vitezei pentru concentrația de isofluran (10 - 35) mg/100 ml probă. S-a liniarizat statistic dependența pe primul domeniu de concentrații, obținându-se ecuația:

viteza = $1,38 \cdot 10^{-4} \cdot [\text{isofluran}] + 0,0119$
unde max dev = $3,43 \cdot 10^{-5}$
 $r^2 = 0,998$

S-a observat o scădere a vitezei procesului enzimatic odată cu creșterea concentrației de halotan din sistemul analizat. Dependența respectivă s-a liniarizat după o ecuație de tipul:

viteza = $-7,95 \cdot 10^{-5} \cdot [\text{halotan}] + 0,0120$
unde max dev = $1,91 \cdot 10^{-4}$
 $r^2 = 0,986$

Studiul experimental este deci extrem de util, făcând posibilă cuantificarea concentrațiilor sangvine de isofluran în intervalul (0 - 10) mg isofluran/100 ml probă. Palierul obținut la concentrații mai mari de isofluran în proba analizată indică faptul că viteza reacției nu este influențată în acest domeniu, putându-se discuta de o saturare a enzimei cu anestezic.

Deoarece activitatea enzimatică este direct proporțională cu viteza reacției și considerând drept referință proba O (în care lipsește anestezicul). S-au calculat și s-au reprezentat grafic procente de modificare a activității enzimatice a peroxidazei (% AE) pentru fiecare concentrație de anestezic (figura 2).

$$\% \text{ AE} = \frac{\text{AE în prezența anestezicului}}{\text{AE în absența anestezicului}} \cdot 100$$

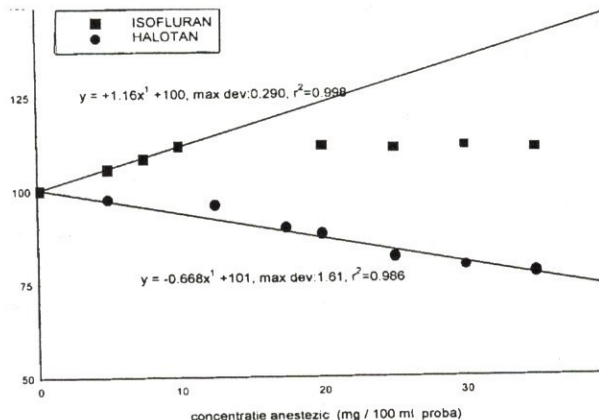


Fig. 2. Variația modificării activității enzimatice în funcție de concentrația anestezicului

$[E] = 8 \cdot 10^{-9} \text{ M}; [S] = 0,841 \text{ mM}$

Din fig 2 se observă că, în cazul utilizării isofluranului, toate %AE sunt mai mari de 100%, ceea ce redă influența activatoare a acestuia asupra sistemului analizat. Se poate astfel indica o posibilă acțiune a isofluranului asupra sistemelor peroxidazice, acțiune ce ar putea completa informațiile teoretice și experimentale din literatura de specialitate, privind mecanismul de acțiune al acestui anestezic.

Și în acest caz s-a remarcat o porțiune liniară ce a putut fi prelucrată matematic:

$\% \text{AE} = 1,16 [\text{isofluran}] + 100$
unde max dev = $0,290$
 $r^2 = 0,998$

S-a observat acțiunea inhibitoare a halotanului asupra sistemului peroxidază - 3,3' - diaminobenzidină - H_2O_2 , fapt ilustrat prin panta negativă a dependențelor:

viteză = $f(\text{concentrație halotan})$
 $\% \text{AE} = f(\text{concentrație halotan})$

Este important de remarcat faptul că halotanul acționează invers isofluranului asupra sistemului enzimatic peroxidază - H_2O_2 . Acțiunea inhibitoare a halotanului în organismele supuse anesteziei este periculoasă, ea putând determina fenomene toxice și procese metabolice secundare datorate acumulării H_2O_2 în diverse țesuturi și organe. Ca urmare și a acestui aspect observat experimental și validat statistic, se poate recomanda utilizarea preferențială a isofluranului în locul halotanului.

Concluzii

Este dificil de apreciat superioritatea evidentă a unuia dintre agenții volatili noi (desfluran și sevofluran) față de isofluran. Există avantaje și dezavantaje ale fiecăruia, care trebuie judecate în funcție de contextul în care sunt utilizate. Practic, anestezia modernă preferă tehnicile combinate, în care efectele secundare ale dozelor mari necesare în monoanestezia inhalatorie sunt mult diminuate; totodată și unele avantaje legate în special de cinetica rapidă a anestezicilor dispar prin asocierea premedicației, a opioizilor și curararizantelor.

Unele efecte secundare sunt de fapt relative, rareori în

anestezie fiind necesare concentrații de anestezic atât de mari la care aceste efecte sunt prezente (ex. fenomenul hipertensiune - tahicardie prezent la MAC > 1,5 pentru desfluran).

Isofluranul se apropie foarte mult de calitățile agentului anestezic ideal datorită maniabilității sale cu un bun și facil control al profunzimii anestezice, datorită stabilității hemodinamice pe care o conferă cu menținerea, chiar ușoară creștere a indexului cardiac, datorită practic nealterării debitului sangvin splahnic, datorită efectelor minime pe care le are asupra debitului sangvin cerebral și buneii protecții neuronale pe care o dă. Și lista beneficiilor nu se încheie aici.

În lucrarea de față am încercat explicarea unor mecanisme de acțiune la nivel molecular al isofluranului și halotanului.

S-a observat că cele două anestezice influențează viteza procesului de transformare a apei oxigenate și activitatea enzimei în mod diferit. Se poate susține experimental ipoteza acțiunii acestor substanțe asupra sistemelor peroxidazice din organismele supuse anesteziei cu isofluran și halotan.

Acțiunea inhibitorie a halotanului asupra sistemului peroxidazic s-a evidențiat experimental prin scăderea vitezei procesului și a activității enzimei, odată cu creșterea concentrației anestezicului în sistem. Astfel, acumularea apei oxigenate la nivelul diverselor țesuturi sau organe poate fi și ea o explicație a proceselor toxice sau a modificărilor metabolice cu risc crescut în cazul organismelor anesteziate cu halotan.

Acțiunea activatoare a isofluranului, demonstrată prin creșterea vitezei procesului și a activității peroxidazei, este un argument în plus pentru recomandarea preferențială a acestui anestezic în diverse intervenții, în locul altor anestezice halogenate.

Folosind statistica matematică și programe computerizate s-au prelucrat datele experimentale și s-au obținut ecuații liniare care caracterizează dependențele vitezelor și activităților enzimice în funcție de concentrațiile celor doi agenți anestezici.

Astfel, în intervalul (0 - 10) mg isofluran/100 ml probă și respectiv (0 - 35) mg halotan/100 ml probă se pot realiza analize cantitative ale anestezicelor amintite prin interpolări pe drepte de etalonare trasate pe baza datelor experimentale prelucrate statistic. Prezentul studiu experimental poate

constitui o modalitate de detecție a concentrațiilor sanguine ale acestor substanțe în organismele supuse anesteziei.

BIBLIOGRAFIE

1. **Colk D.J., Kalichman M.W., Shapiro M.H. et Coll.:** The nonlinear potency of sub-MAC concentrations of nitrous oxide in decreasing the anesthetic requirement of enflurane, halothane and isofluran in rats, *Anesthesiology*, 73, 93 - 99, (1990)
2. **Mustaki J.P., Gaumann D., Tassony E.:** MAC-awake of isoflurane evaluated by slow and fast alveolar wash-out, *Anesthesiology*, 73, A338 (1990)
3. **Rosenbeg H.:** Malignant hyperthermia, *Ann. Refr. C.*, 225, 1 - 6, (1994)
4. **I. Murat, Lechene P., Ventura-Chapier R.:** Effects of volatile anesthetics on mechanical properties of rat cardiac skinned fibers, *Anesthesiology*, 73, 73 -81, (1990)
5. **Komai H., Rusy B.F.:** Direct effect of halothane and isoflurane on function of the sarcoplasmic reticulum in intact rabbit atria, *Anesthesiology*, 72, 694 - 698, (1990)
6. **Kenna S.G., Jones R.M.:** The organ toxicity of inhaled anesthetics, *Anesth. Analg.*, 81, S51 - 66, (1995)
7. **Mehendale H.M., Roth R.A., Gandolfi A.J., Klaunig J.E., Lemasters J.J., Curtis L.L.:** Novel mechanisms in chemically induced hepatotoxicity, *FASEB Journal*, 8, 1285 - 1295, (1994)
8. **Adachi K., Takahashi S., Melzer P., Campos K.L., Nelson T., Kennedy C., Sokoloff L.:** Increases in local cerebral blood flow associated with somatosensory activation are not mediated by NO, *Heart and Circulatory Physiology* 36, H2155 - H2162 (1994).
9. **Pop M., Coman Gh., Drăghici C.:** Kinetical study of the peroxidase and 3,3 - diaminobenzidine, *Bull. of the Transilvania Univ. of Brașov*, 3 (38) series B, 69 - 72, (1996)
10. **Pop M., Drăghici C., Bandac M., Jăjâie S., Insurățalu L., Vărtosu A., Coman Gh.:** The activation and inhibition studies on the peroxidase, *Bull of the Transilvania Univ. of Brașov* 4 (39), 93 - 96 (1997)
11. **Roman L., Bojița M., Săndulescu R.:** Validarea metodelor de analiză și control, *Ed. Medicală, București* 1998, p. 75