



ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ СУПЕРОКСИДИСМУТАЗЫ ПРИ СУДОРОЖНЫХ ПРИПАДКАХ, ВЫЗЫВАЕМЫХ КОРАЗОЛОМ

СИМОНЯН М. А., ТАБАЧИНКОВА С. И., ГРОМОВ Л. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван,
Институт фармакологии и токсикологии МЗ УССР, Киев

В опытах на белых крысах линии Вистар установлено, что коразол в токсической дозе (50—70 мг/кг), вызывающей судорожные припадки и гибель животных, приводит к снижению активности супероксиддисмутазы: в печени на 30—35, крови на 10—12, мозгу на 4—5%.

Экзогенно введенная Cu, Zn-супероксиддисмутаза полностью предотвращала гибель животных при введении коразола в дозе ЛД₅₀ (50 мг/кг) и в 50% случаев предотвращала гибель крыс при действии коразола в дозе ЛД₁₀₀ (70 мг/кг).

Одновременно с этим наблюдалось значительное укорочение судорожного периода и выраженное облегчение клинического состояния животных, что связано не с взаимодействием фермента с коразолом, а с регулирующей липидной пероксидацией в биомембранах с участием супероксидных радикалов.

В настоящее время механизм развития судорожных припадков у больных эпилепсией и экспериментально вызванных судорожных состояний у животных связывается с повышенным уровнем возбудимости мозга в результате нарушения синаптической передачи [1, 2]. Вместе с этим в последние годы установлена важная роль свободнорадикальных процессов в регуляции трансмембранного ионного тока, который во многом определяет возбудимость нейрона [3].

Известно также, что при различных патологических состояниях существенно усиливается перекисное окисление липидов (ПОЛ) в клеточных мембранах [4, 5]. В очагах эпилептической активности в коре головного мозга резко активизируется ПОЛ [6]. Предварительное введение животным антиоксидантов: α -токоферола [6], пинола [7], фенозана и пэггинола [8] предотвращало эффект активации ПОЛ в очаге и значительно подавляло эпилептическую активность [9].

С точки зрения этих данных, необходимо было также изучить активность, качественное изменение и влияние широко распространенного в организме фермента — супероксиддисмутазы (СОД) при судорожных состояниях (в данном случае при судорогах, вызванных введением коразола [10, 11]), так как этот фермент является естественным, своеобраз-

ным ангиоксидантом [12] и посредством регуляции липидной пероксидации (с участием супероксидных анионов) [13] способен стабилизировать биомембраны [14—17]. С другой стороны, поскольку образовавшиеся перекиси способны инактивировать этот фермент [18, 19], необходимо было исследовать компенсирующее влияние экзогенно введенной СОД на клиническое течение судорожных состояний у животных.

Материалы и методы

В опытах были использованы 170 крыс массой 170—240 г. Судорожные состояния вызывали введением коразола в дозах 50 и 70 мг/кг внутримышечно. Контрольные животные получали физиологический раствор, содержащий 0,01 М фосфатный буфер, pH 7,4. Крыс забивали декапитацией.

СОД выделяли из 50—60 г печени крыс по методу Григорян и соавт. [20], модифицированному нами, количество фермента определяли спектрофотометрически, исходя из величины коэффициента молярной экстинкции при 680 нм, равной $300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. СОД-содержащую фракцию из эритроцитов получали по методу McCord и Fridovich [12], а из мозга после предварительной его обработки ацетоном и эфиром. Таким путем у 60 опытных (которым вводился коразол в дозе 70 мг/кг) и 30 контрольных животных было определено количество СОД в печени и супероксиддисмутазная активность в крови и мозгу по методу Mista и соавт. [21] и Symonuan и соавт. [22].

Оптические спектры поглощения были записаны на приборе «Beckman—26» (США), а спектры ЭПР—на приборе «Varian E-4» (США).

Для очистки СОД из печени крыс использовали DE-52 целлюлозу фирмы «Whatman» и сепадекс G-75 фирмы «Pharmacia». Остальные химикаты, использовавшиеся в работе, были отечественного производства. Активность ПОД в гомогенатах ткани и плазме крови определяли, измеряя концентрацию продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [23, 24].

Противосудорожное и защитное действие экзогенной СОД (при действии коразола в токсических дозах) исследовали на 80 крысах. СОД, выделенную из эритроцитов крови быка и разведенную в 0,01 М калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 0,9% NaCl, вводили внутримышечно в дозах 0,5—1,6 мг/кг в разные сроки введения коразола.

Результаты и обсуждение

Коразол в дозах 50 и 70 мг/кг вызывал типичную картину судорожных состояний. Через 2—3 мин после инъекции у животных наблюдали кратковременную загорможенность. На 3—6 мин возникали насильственные реакции типа миоклонических вздрагиваний головы, а затем всего тела, гиперкинезы конечностей, иногда кратковременные судорожные припадки без утраты естественной позы. В этот период животные проявляли повышенную чувствительность к внешним раздражителям (звуковым, тактильным), которые легко провоцировали либо усиливали судорожные приступы.

На 9—16 мин у животных развивались генерализованные судороги с ярко выраженным тоническим компонентом. Крысы принимали боковое положение, наблюдались нарушения ряда вегетативных функций (тахипноэ, апноэ, обильное слюноотделение, мидриаз и др.). В большинстве случаев непрекращающиеся судорожные припадки приводили к развитию коматозного состояния и гибели животных через 25—30 мин после введения коразола, причем при дозе 50 мг/кг погибло 50% животных, то есть она соответствовала ЛД₅₀. Коразол в дозе 70 мг/кг приводил к 100%-ной гибели после периода судорожных припадков.

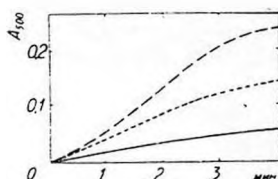


Рис. 1. Кинетические кривые окисления адреналина в адренохром. Без добавления фермента (—), с добавлением 5 · 10⁻⁹ М СОД из печени подопытных (— · — · —) и контрольных (.....) крыс

В развитии коразоловых судорог наблюдались два четко разграниченных периода: предсудорожный, характеризующийся различными мнуклониями и гиперкинезами, и период генерализованных судорог, переходящих в эпилептический статус, которые в литературе сравниваются с клинической картиной малых и больших припадков [10]. Вот почему изменения СОД изучались в оба периода.

При коразоловом припадке в первом периоде существенных изменений активности СОД не наблюдалось, а во втором она заметно понижалась (рис. 1), особенно в печени (на 30—35%). Этот результат подтверждался и после выделения и очистки СОД из печени контрольных и опытных крыс. Спектры поглощения СОД, выделенной во втором периоде припадка, приведены на рис. 2, а, б. Поглощение при 680 нм при судорожном припадке (II период) было уменьшено на 30—35% по сравнению с контролем (ЭПР-спектры также показывают, что при этом медь фермента восстанавливается на 30—35%), а в УФ-области спектра при 265 нм уменьшения почти не наблюдалось. Отсюда можно предположить, что в судорожный период инактивирование СОД происходило из-за восстановления меди фермента перекисями и супероксидными [23]. При припадке эффект коразола не был связан с его непосредственным влиянием на СОД, поскольку в опытах *in vitro* нам не удалось обнаружить каких-либо изменений в ЭПР и оптических спектрах СОД, а также в активности фермента после инкубации его с коразолом в течение нескольких часов. Учитывая, что коразол сочетает в себе свойства антилептика и судорожного яда, можно предположить, что он, стимулируя дыхательный центр продолговатого мозга и активируя внешнее дыхание, приводит к накоплению кислорода в организме, образованию супероксидов и перекисей в количествах, превышающих оптимальные соотношения фермент-субстрата, а значительное повышение количества супероксида само по себе угнетает активность СОД, восстанавливая медь фермента [22].

Одновременно было показано, что количество ТБК-активных продуктов ПОЛ в гомогенатах мозга и печени, а также в плазме крови при судорожных состояниях, вызываемых коразолом, в среднем повышалось в 1,5—3 раза (особенно в печени) по сравнению с контролем.

При предварительном внутримышечном введении животным СОД (1 мг/кг) за 1 ч до инъекции коразола в дозе 50 мг/кг уровень этих ТБК-активных соединений почти не возрастал.

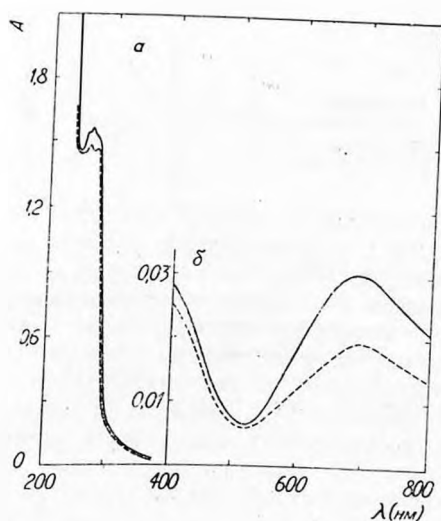


Рис. 2. Спектры поглощения СОД, выделенной и очищенной из печени крыс при коразоловом судорожном припадке (во втором периоде). УФ-спектр (α) и видимый спектр (δ) СОД из печени контрольных (—) и подопытных (...) крыс

Нет сомнений в том, что при судорожных состояниях СОД может быть инактивирована не только избытком супероксидов, но и за счет взаимодействия с образовавшимися перекисями [13, 18, 19].

В специальной серии опытов было проверено влияние введения СОД на протекание судорожного процесса. Результаты исследований показали, что предварительное (за 1 ч) введение СОД полностью предотвращало гибель животных при действии коразола в дозе 50 мг/кг (таблица). При этом у крыс отмечалось значительное укорочение судорожного периода и выраженное облегчение клинического состояния. У животных не развивалось комы, и они не принимали бокового положения. Ни в одном случае не было зарегистрировано развитие эпилептического статуса, судороги носили стертый характер.

При действии коразола в дозе 70 мг/кг (LD_{100}) СОД на 50—60% увеличивала выживаемость животных. При этом наблюдалось клиническое облегчение протекания судорожного состояния.

Влияние экзогенной супероксиддисмутазы на выживаемость крыс при действии коразола

Группы животных	Вводимые вещества, мг/кг	Количество животных в группе	Количество погибших животных
I	Коразол	12	6
II	Экзогенная супероксиддисмутаза (1,0) + коразол (50)	10	0
III	Коразол (70)	22	$p < 0,05$ 22
IV	Экзогенная супероксиддисмутаза (1,0 + 1,6) + коразол (70)	35	15 $p < 0,05$

Как известно, ингибирование СОД приводит к избыточному накоплению супероксидов, тем самым нарушая функцию клеточных мембран [26]. Не исключено, что эффект коразола связан с нарушениями в нейрональных, и в частности синапсомных мембранах. Поэтому можно предположить, что защитное действие СОД при судорожных состояниях связано со способностью этого фермента путем уменьшения количества супероксидов регулировать липидную перекисную реакцию в мембранах. Поэтому экзогенно введенная СОД оказывает не только противосудорожное влияние, но и способствует выживаемости животных.

Таким образом, СОД можно рекомендовать в качестве антагониста токсического (судорожного) действия коразола.

PROTECTIVE EFFECT OF SUPEROXIDE DISMUTASE ON CORASOL-INDUCED CONVULSIONS

SYMONYAN M. A., TABACHNIKOVA S. I., GROMOV L. A.

Institute of Biochemistry, Armenian SSR Academy of Sciences, Yerevan,
Institute of Pharmacology, Ukrainian SSR Ministry of Health, Kiev

It has been established that a toxic, convulsions inducing dose of corasol (50–70 mg/kg bw) leads to decrease in the activity of superoxide dismutase (SOD) in rat liver (for 30–35%), blood (10–12%) and brain (4–5%). Administration of Cu, Zn-SOD to animals treated with LD₅₀ of corasol (50 mg/kg bw) prevents death of all animals. In the case of LD₁₀₀ of corasol (70 mg/kg bw) 50% of animals escaped death. At the same time administration of SOD shortens the period of convulsions. This effect of SOD is due to regulation of lipid peroxidation in biomembranes by superoxide radicals.

ЛИТЕРАТУРА

1. Громов Л. А. Нейромедиаторные механизмы и экспериментальная терапия судорожного припадка. Автореф. докт. дис., К., 1973.
2. Черченко А. П. Роль медиаторных систем базолатеральной зоны миндалевидного комплекса и среднего гипоталамуса в формировании височного эпилептического приступа. Автореф. канд. дис., К., 1982.
3. Неделина О. С., Бржезская О. П., Киюшин Л. П. Свободнорадикальный механизм синтеза аденозинтрифосфата в осветительном фосфорилировании. М., ВИННТИ, с. 52, 1981.
4. Меерсон Ф. З., Каган В. Е., Прилико Л. Л. Бюл. эксперим. биол. и мед., 87, 404—406, 1979.
5. Николаев С. М. Влияние селената натрия, α -токоферола и их комбинации на течение экспериментального инфаркта миокарда. Автореф. канд. дис., М., 1976.
6. Крыжановский Г. Н. Журн. невропатол. и психиатрии, 76, 1730—1735, 1974.
7. Никушин В. Е., Браславский В. Е., Крыжановский Г. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., 90, 696—698, 1980.
8. Архипова Г. В., Буракова Е. Б., Семюхина А. Ф., Федотова Н. Б., Крушинский Л. В. Докл. АН СССР, 267, 469—471, 1982.
9. Крыжановский Г. Н., Никушин В. Е., Браславский В. Е., Глебов Р. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., 89, 14—16, 1980.
10. Авакян Р. М. Некоторые нейрофизиологические и нейрохимические механизмы коразоловых судорог. Автореф. канд. дис., М., 1977.
11. Симонян М. А., Табачникова С. И., Громов Л. А. Девятая всесоюзная конференция по биохимии нервной системы, Ереван, 314, 1983.
12. McCord J., Fridovich I. J. Biol. Chem., 244, 6045—6055, 1969.
13. Симонян М. А., Налбандян Р. М., Ментарян В. Г. III Всесоюзный симпозиум «Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животных и человека», Л., 1978.
14. Fee J. A., Teitelbaum D. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 49, 150—156, 1972.
15. Linch R. E., Fridovich I. J. Biol. Chem., 253, 1838—1845, 1978.
16. Ching-san L., Piette L. H. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 76, 51—59, 1977.
17. Pogossian G. G., Nalbandyan R. M. Lipids, 15, 591—593, 1980.
18. Symonyan M. A., Nalbandyan R. M. FEBS Lett., 28, 22—24, 1972.
19. Bray R. C., Cockle S. A., Fielden E. M., Roberts P. R., Rotillo G., Calabrese L. Biochem. J., 139, 43—48, 1974.
20. Григорян Н. А., Гюльхандян Г. В., Симонян М. А., Налбандян Р. М. Биохимия, 42, 1499—1505, 1977.
21. Misra H. P., Fridovich I. J. Biol. Chem., 247, 3170—3175, 1969.
22. Symonyan M. A., Nalbandyan R. M. Biochim. et biophys. acta, 58, 3, 279—286, 1979.
23. Asakava T., Matsushita S. Lipids, 14, 401—406, 1979.
24. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
25. Weser U., Barth G., Djerassi C., Hartman H. J., Krauss P., Voelcker W., Voetsch W. Biochim. et biophys. acta, 278, 28—36, 1972.
26. Zimmerman R., Flohe L., Weser U., Hartman H. J. FEBS Lett., 29, 117—122, 1973.

Поступила 1.XII 1983