

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ГАМК И ЕЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ – ПИРРОЛИДОНА-2 И γ -БУТИРОЛАКТОНА

А.А.Манукян

/Ереванский государственный медицинский университет им. М.Гераци,
кафедра фармакологии/
375025 Ереван, ул. Корюна, 2

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, малоновый диальдегид, антиоксидантная активность, ГАМК, пирролидон-2, γ -бутиролактон

Нарушение баланса между образованием и удалением перекисей липидов приводит к их избыточному накоплению, играющему определенную роль в дезорганизации клеточных мембран и патогенезе ряда заболеваний. К различным патологическим состояниям могут привести чрезмерная активность прооксидантной системы и (или) недостаточная активность антиоксидантной. Прооксидантная система активируется при ишемии и стрессе. Стресс приводит к активации симпатической нервной системы и в результате к избытку катехоламинов, при окислении которых, в частности адреналина, образуется семихинон адреналина, который способен сбрасывать электрон на кислород и вызывать генерацию супероксидрадикала – важного индуктора перекисного окисления липидов (ПОЛ) [6].

Показателем интенсивности ПОЛ является скорость накопления малонового диальдегида (МДА), высокая концентрация которого может вызвать повреждение мембран [5,8]. МДА, вызывая выраженное снижение локального мозгового кровотока, фактически приводит к ишемии в данной области и тем самым создает условия для ПОЛ [2]. МДА приводит к сокращению изолированного лоскута мозговых артерий [3]. ГАМК и ее циклические производные снимают и предотвращают вызванное МДА сокращение мозговых артерий [3].

Учитывая вышеизложенное, мы задались целью выяснить, обладают ли ГАМК и ее циклические производные пирролидон-2 и γ -бутиролактон антиоксидантной активностью в условиях *in vitro*.

Материал и методы

Антиоксидантная активность (АОА) ГАМК и ее циклических производных определялась методом, сущность которого заключается в оценке АОА исследуемой жидкости посредством определения ее ингибирующего действия на свободнорадикальное окисление мембран эритроцитов, в которых окисление индуцируется УФ-светом. О наличии антиоксидантной активности судили по разнице в оптической плотности между опытной и контрольной пробами.

Для выделения мембран эритроцитов использовали метод Limber G.R. et al. [7]. Из 100 мл донорской крови отделяли эритроциты и после их отмывания от плазмы добавляли равный объем 0,1 М фосфатного буфера рН 7,4 и 20-кратный объем гипотонического раствора хлористого кальция (0,025 М). Суспензию тщательно встряхивали и оставляли на 30 мин при 4°C. Осадок отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 3000 об/мин и затем 3 раза отмывали в 10-кратном объеме фосфатного буфера 0,01 М рН 7,4 с последующим центрифугированием. Осадок суспендировали в физиологическом растворе таким образом, чтобы общий объем соответствовал исходному объему суспензии эритроцитов в фосфатном буфере.

К 1 мл суспензии мембран эритроцитов добавляли 0,02 мл исследуемой жидкости, перемешивая, вносили в кювету от фотоэлектрокалориметра и облучали бактерицидной лампой БУФ-15 в течение 30 мин на расстоянии 80–100 мм. В контрольную пробу вместо исследуемой жидкости вносили 0,02 мл физиологического раствора или раствор тиобарбитуровой кислоты. рН суспензии мембран эритроцитов в процессе облучения не изменяется. Время облучения выбрано в этих условиях как оптимальное, так как кривая накопления индуцированного МДА выходит на плато уже через 25 мин. После облучения к пробам прибавляли по 1 мл 28% раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивали и центрифугировали 10 мин при 6000 об/мин. Центрифугат переносили в узкие пробирки, смешивали с 1 мл 0,8% раствора тиобарбитуровой кислоты и нагревали в водяной бане 15 мин, после чего пробирки быстро охлаждали в холодной воде и определяли экстинкцию опытной и контрольной проб против воды (или раствора тиобарбитуровой кислоты) на спектрофотометре при длине волны 532 мм. Разница в оптической плотности между опытной и контрольной пробами соответствует АОА исследуемой жидкости, величина которой выражается в процентах ингибирования свободнорадикального окисления в опытной пробе по отношению к контрольной.

$$\text{Формула расчета: } \text{АОА} = 100 - \frac{\text{оптическая плотность опыта}}{\text{оптическая плотность контроля}} \times 100 \%$$

Результаты и обсуждение

В наших опытах оптическая плотность контрольных проб составила $0,0775 \pm 0,0018$ ($n=20$; $p < 0,05$). В опытных пробах, в которых концентрация ГАМК, пирролидона-2 и γ -бутиролактона составляли 10^{-4} М, оптическая плотность составляла соответственно 0,065; 0,04375 и 0,04125.

Таблица

Антиоксидантная активность ГАМК, пирролидона-2 и γ -бутиролактона

Условия опыта	Антиоксидантная активность, %
Контроль	100
ГАМК (10^{-4} М)	16.25 ± 3.41
Пирролидон-2 (10^{-4} М)	43.12 ± 2.38
γ -бутиролактон (10^{-4} М)	46.38 ± 1.62

Примечание. $p < 0.05$; $n=20$

Из данных, приведенных в таблице, следует, что циклические производные ГАМК — пирролидон-2 и γ -бутиролактон — по антиоксидантной активности превосходят ГАМК, что, по всей вероятности, может быть связано с химическим строением этих веществ, а именно с циклическостью их молекул. Эти вещества в данном случае способны выполнять роль "уборщика" активных радикалов, тем самым приводя к обрыву цепной реакции образования активных радикалов и в итоге — антиоксидантному эффекту.

Исследования по выявлению связи между химическим строением различных веществ и их антиоксидантной активностью представляются весьма перспективными в плане создания новых препаратов, обладающих антиоксидантной активностью. В этом плане большой интерес представляют ГАМК и ее циклические производные, так как они, будучи эндогенными веществами, обладают разнообразными функциями, в том числе антигипоксантами и антиагрегантами.

Нами уже подчеркивалась важная патофизиологическая роль ненасыщенных жирных кислот при различных патологиях. Высвобождение полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) является результатом активации фосфолипазы A_2 , наблюдающейся при действии возбуждающих аминокислот, антагониста ГАМК — бикукулина. Активность ПОЛ в ткани зависит от содержания субстрата перекисления — ПНЖК, интенсивности функционирования систем генерации активных форм кислорода, уровня прооксидантов (металлы переменной валентности, восстановители), активности антиоксидантных ферментов, содержания антиоксидантов и других факторов. Некоторые из этих ПНЖК, в частности арахидоновая кислота, могут привести к усилению агрегации тромбоци-

тов, способствовать активации ПОЛ благодаря своей способности угнетать проявления действия ГАМК и ее производных, которые способны подавлять процессы ПОЛ путем предотвращения выброса возбуждающих медиаторов [10,11]. Важная роль в усилении процессов липидной перекисидации придается фосфатидил-холин-специфичной фосфолипазе С, при участии которой генерируются вторичные посредники — диацилглицерол и 1-, 4-, 5-трифосфоинозитол, способствующие увеличению концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , приводящего к активации ПОЛ [4]. Активация ПОЛ наблюдается при ишемии, которая приводит к накоплению доноров электронов — восстановленных переносчиков. Так, добавление NADH к субмитохондриальным частицам приводит к образованию супероксидного радикала и усилению ПОЛ [10]. При ишемии повышается количество МДА, понижается активность супероксиддисмутазы и каталазы — важных антиоксидантных ферментов. Следует подчеркнуть, что идентичные изменения наблюдаются и при реперфузии, следующей за ишемией [9].

Таким образом, результаты наших экспериментов и литературные данные дают основание считать, что ГАМК и ее циклические производные при детальном исследовании их стресс-протекторной активности должны занять важное место в арсенале лекарственных средств, применяемых для повышения адаптивной резистентности организма к воздействию экстремальных факторов.

Поступила 31.10.97

ԳԱԿԹ-Ի ԵՎ ՆԲԱ ՑԻԿԼԻԿ ԱԾԱՆՅՅԱԼՆԵՐԻ՝ ՊԻՐՈԼԻԴՈՆ-2 ԵՎ
Գ-ԲՈՒՏԻՐՈԼԱԿՏՈՆԻ ՀԱԿԱՕՔՍԻԴԱՆՏԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա.Ա. Մանուկյան

Հայտնաբերվել է նոր փաստ, համաձայն որի ԳԱԿԹ-ն եւ նրա ցիկլիկ ածանցյալները՝ պիրոլիդոն-2 եւ Գ-բուտիրոլակտոնը դրսևորում են հակաօքսիդանտային ակտիվություն *in vitro* պայմաններում: Այդ տվյալները թույլ են տալիս դասել այդ միացությունները այն դեղամիջոցների շարքին, որոնք կարող են օգտագործվել օրգանիզմի հարմարվողական դիմակայունությունը էքստրեմալ ազդեցությունների հանդեպ բարձրացնելու համար:

THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF GABA AND ITS CYCLIC DERIVATIVES
PYROLIDONE-2 AND γ -BUTYROLACTONE

A.A. Manoukian

It is determined that GABA and its cyclic derivatives γ -butyrolactone and pyrrolidone-2 show antioxidant activity *in vitro* conditions. The antioxidant activity of γ -butyrolactone predominates the one of pyrrolidone-2 and GABA. These data allow to consider these compounds as drugs that can be used for increase of the adaptive resistance of the organism to extremal conditions.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Меерсон Ф.З.* Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. М., 1984.
2. *Мирзоян С.А., Мкртчян С.Л., Манукян А.А.* Фармакол. и токсикол., 1993, 4, с. 18.
3. *Манукян А.А., Мирзоян С.А., Акопян В.П.* Экспер. и клин. мед. НАН РА, 1993, 1-2, с. 98.
4. *Birkle D.L.* Adv. Exp. Med. Biol., 1992, 318, p. 57.
5. *Debouzy J.C., Fauvelle F., Vezin H. et al.* Pharmacol., 1992, 44(9), p. 1787.
6. *Dilberto E.L., Allen P.L.* J. Biol. Chem., 1981, 256, 7, p. 3385.
7. *Libmer G.R., Davie R.F., Baur A.M.S.* Blood, 1970, 36, 2, p. 111.
8. *Ma N.S.* Chung-Hua-Cheng-Hsing-Shang-Wai-Ko-Tsa-Chin., 1992, 8(2), p. 127.
9. *Prasad K., Lee P., Mantha S.V. et al.* Mol. Cell. Biochem., 1992, 115(1), p.49.
10. *Ramsay R.R., Singer T.P.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 1992, 189(1), p. 47.
11. *Schwartz R.D., Yu X.* Brain. Res., 1992, 585(1-2), p. 405.

