

УДК 612.8.015

Академик АН Армянской ССР Г. Х. Бунятян, Н. А. Есаян, А. Р. Арменян

О проникновении гамма-аминомасляной кислоты через гемато-энцефалический барьер

(Представлено 19/III 1968)

При изучении взаимоотношений между некоторыми нейроактивными веществами в мозгу выяснилось, что гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), определенным образом влияет на обмен катехоламинов в мозгу и в других тканях (¹) и серотонина в мозгу. Ряд данных, полученный нами позволил предположить, что часть парентерально введенной ГАМК проникает в мозг, особенно в те отделы его, которые богаты нейроактивными веществами—средний мозг, в частности, гипоталамус.

Вопрос проникновения ГАМК через гемато-энцефалический барьер нельзя считать окончательно решенным. Ряд авторов отрицает проницаемость этого барьера в отношении ГАМК. Считается, что она проникает в мозг у взрослых животных при повреждении гемато-энцефалического барьера. Однако недавние исследования показали, что при повреждении некоторых участков мозга путем их охлаждения ГАМК проникала не только в эти участки, но и в неповрежденные части мозга (²). Ряд работ (³) и исследования, проведенные Казаряном в нашей лаборатории с равномерно меченой ГАМК, показали, что она проникает в мозг из крови.

По современному представлению, нейроактивные вещества—ацетилхолин, норадреналин, серотонин, ГАМК, как в мозгу, так и в периферических нервных окончаниях находятся в прочно- и слабо-связанных формах, а также в свободном состоянии. Физиологической активностью обладают свободные или слабо связанные формы этих веществ. Исследования Эллиотта и сотр. (^{4,5}) показали, что большая часть связанной ГАМК высвобождается из мозговой ткани в таких средах, которые употребляются для выделения субклеточных частиц, например, в 0,25 М растворе сахарозы. В мозговой ткани ГАМК находится в двух разных пулах, в одном из которых она связана лабильно, в другом—более прочно. По всей вероятности, эти два вида пула локализованы в разных морфологических структурах мозга. Прочно связанная ГАМК обнаружена, в основном, в нервных окончаниях (⁶), а слабо связанная, по всей вероятности, сосредоточена в

рецепторах. Свободная ГАМК считается переходной формой между этими двумя пулами (5).

По-видимому, в физиологической активности ГАМК важную роль играют количественные изменения ее свободной и слабо связанной форм в определенных областях мозга, а не колебания ее общего количества в целом мозгу. Как показали исследования Эллиотта (4), инсулин, карбазидные соединения и вообще вещества, снижающие уровень ингибирующего фактора, уменьшают прочно связанный ГАМК, тогда как вещества повышающие уровень ее в мозгу, такие как гидроксилламин и ипразид, наоборот, увеличивают содержание свободной формы ГАМК. В нашем институте было показано, что при внутрибрюшинном введении ГАМК содержание свободной ГАМК повышается в гипоталамусе и понижается в полушариях через 2 минуты после ее введения (7). Однако принимаемая доза ГАМК (10 мг/кг) и время (2 мин) в этих экспериментах не соответствовали условиям наших опытов, где изменения содержания катехоламинов и серотонина отмечались через 20 минут после внутрибрюшинного введения 5 мг/кг и через 15 мин после внутрикаротидного введения 0,5 мг/кг ГАМК. Поэтому мы сочли целесообразным изучить изменения в содержании свободной и связанной ГАМК в разных частях мозга в условиях, соответствующих нашим предыдущим опытам.

Исследования проводили на белых крысах весом 120—150 г. ГАМК (5 и 0,5 мг/кг) вводили внутрибрюшинно и внутрикаротидно соответственно. Животных забивали декапитированием через 20 минут после внутрибрюшинного и через 10 минут после внутрикаротидного введения. Отделение соответствующих частей мозга, взвешивание, гомогенизацию производили в течение двух минут. Ткань гомогенизировали при комнатной температуре в 4-х кратном объеме рингер-фосфатного раствора и гомогенат центрифугировали при 15.000g в течение 30 минут по Эллиотту (4). К надосадочной жидкости, которая содержит свободную ГАМК, прибавляли 0,1 объема 4н. HClO_4 , осадок суспензировали в 1 мл 0,4 н. HClO_4 . ГАМК определяли в 0,1 мл перхлорного экстракта, соответствующего приблизительно 5 мг ткани микрофлюорометрическим методом по Лове и сотр. (8) на Farrand spectrophotofluorometer'e, при 365 и 480 $m\mu$. Проверка показала что, этот метод отличается большой чувствительностью и дает возможность определить незначительные колебания ГАМК в небольшом количестве ткани.

В начальных экспериментах флюорометрическим способом определяли количество ГАМК в разных отделах мозга: в гипоталамусе оно составляло 411, в полушариях 352, в продолговатом мозгу 236 $мкг/г$. Эти величины совпадают с литературными данными (9, 10). Для уточнения количества свободной и связанной ГАМК в одном полушарии того же мозга определяли количество общей ГАМК, в другом — ее свободные и связанные формы. Сумма последних оказалась равной количеству общей ГАМК в соседнем полушарии.

Сначала в полушариях, в среднем мозгу, в варолиевом мосту вместе с продолговатым мозгом определяли количества свободной и связанной ГАМК через 20 мин после ее внутрибрюшинного введения в количестве 5 мг/кг; однако достоверных изменений как в отношении свободной, так и связанной ГАМК сравнительно с контрольными опытами не были обнаружены. Затем в тех же экспериментальных условиях определяли количество свободной и связанной ГАМК в различных отделах гипоталамуса. При изучении проникновения в мозг катехоламинов Лихтенштейгер путем гистохимической флюоресценции (11) показал, что некоторые области вентральной части гипоталамуса—как *area retrochiasmatica*, *median eminence*, ядра *periventricular* и *arcuate* поглощают значительную часть введенного норадреналина, т. е. некоторые области вентральной части гипоталамуса обладают большей проницаемостью, чем другие части мозга.

Исходя из этих данных мы разделяли гипоталамус горизонтальным сечением на вентральную и дорзальную части. Полученные нами результаты показывают, что через 20 мин после внутрибрюшинного введения ГАМК (5 мг/кг) в вентральной части гипоталамуса крыс количество свободной ГАМК (табл. 1) значительно увеличивается. Этого не наблюдалось в отношении связанной ГАМК.

Таблица 1

Количество связанной и свободной гамма-аминомасляной кислоты (мкг/кг свежей ткани) в вентральной и дорзальной частях гипоталамуса через 20 минут после ее внутрибрюшинного введения (5 мкг/кг)

	Вентральный гипоталамус			Дорзальный гипоталамус		
	свободная	связанная	общая	свободная	связанная	общая
Контроль	163±9 (12)*	269±19 (12)	432±27 (12)	171±10,9 (12)	260±15 (12)	431±23 (12)
Гамма-аминомасляная кислота	238±13** (12)	295±17 (12)	533±21** (12)	184±7 (12)	282±8,6 (12)	466±9 (12)

* Число опытов

** $p < 0.005$

Количества свободной и связанной ГАМК в дорзальной части гипоталамуса не отличаются от вентральной и после введения ГАМК уровень ее не подвергается достоверным изменениям. Нужно полагать, что ГАМК проникает в вентральную часть гипоталамуса и не переходит оттуда в дорзальные части. Исходя из этих данных мы в последующих экспериментах изучали только вентральную часть гипоталамуса.

Согласно Бертлеру (12) в гипоталамусе у человека норадреналин сосредоточен в основном в его передней и средней частях. Аналогичные данные были получены относительно других животных. Специфическая для катехоламинов флюоресценция обнаружена в основном

в преоптической области, супраоптическом, паравентрикулярном и перивентрикулярном ядрах. В заднем гипоталамусе обнаружены только единичные катехоламиновые нервные волокна (13).

С целью объяснения эффекта ГАМК в отношении катехоламинов мозга мы использовали те отделы гипоталамуса, где содержание этих аминов наиболее высокое. Действие внутрибрюшного введения 5 мг/кг ГАМК на ее свободные и связанные формы изучали в переднем и заднем отделе вентрального гипоталамуса. Результаты исследований (табл. 2) показали, что достоверное увеличение ГАМК ($p < 0,01$) отмечается только в переднем отделе вентрального гипоталамуса за счет ее свободной формы.

Таблица 2

Количество свободной и связанной гамма-аминомасляной кислоты (мкг/г свежей ткани) в передней и задней частях вентрального гипоталамуса через 20 минут после ее внутрибрюшинного введения (5 мг/кг)

	Передний			Задний		
	свободная	связанная	общая	свободная	связанная	общая
Контроль	148±5 (10)*	279±33 (10)	427±27 (10)	143±16 (12)	304±9 (12)	447±12 (12)
Гамма-аминомасляная кислота	204±9** (10)	276±44 (10)	481±21** (10)	159±6,9 (12)	308±16 (12)	467±25 (12)

* Число опытов

** $p < 0,01$

Представляло интерес изучить изменение уровня свободной ГАМК в других отделах мозга (кора полушарий и продолговатый мозг) под влиянием внутрикаротидного введения ГАМК (0,5 мг/кг), которая в наших прежних экспериментах понижала содержание норадреналина в мозгу (1). Полученные данные (табл. 3) еще раз показали увеличение свободной ГАМК в вентральном гипоталамусе без изменения ее связанной формы. Интересно, что количество свободной ГАМК понижалось в коре полушарий, и не протерпевало изменений в продолговатом мозгу.

Как было указано, выше, по данным Казарян, Гулян (2), через 2 минуты после внутрибрюшного введения 10 мг/кг ГАМК, повышается уровень свободной ГАМК в гипоталамусе. Полученные нами данные подтверждают эти результаты, показывая достоверное повышение свободной ГАМК в передней части вентрального гипоталамуса. Как известно из литературных данных ГАМК проникая в мозг, обнаруживается в свободной форме (2). Наши предыдущие эксперименты с аминоксиуксусной кислотой показали, что понижение уровня норадреналина в гипоталамусе отмечается при небольшом повышении эндогенной ГАМК в среднем мозгу. Исходя из вышеизложенного мож-

Таблица 3

Количество свободной и связанной гамма-аминомасляной кислоты (мкг/г свежей ткани) в различных отделах мозга через 10 минут после ее внутривенного введения (0,5 мг/кг)

	Вентральный гипоталамус			Кора полушарий			Продолговатый мозг		
	свободная	связанная	общая	свободная	связанная	общая	свободная	связанная	общая
Контроль	161 ± 14 (8)*	250 ± 17 (8)	441 ± 25 (8)	194 ± 9 (10)	158 ± 13 (10)	352 ± 16 (10)	130 ± 7 (10)	106 ± 11 (10)	236 ± 14 (10)
Гамма-аминомасляная кислота	209 ± 15** (8)	279 ± 14 (8)	488 ± 22** (8)	155 ± 15** (10)	136 ± 13 (10)	291 ± 22** (10)	136 ± 12 (10)	121 ± 15 (10)	257 ± 20 (10)

* Число опытов

** $p < 0.05$

но предположить, что отмеченное нами незначительное повышение уровня свободной ГАМК, особенно в участках гипоталамуса, богатые моноаминергическими нейронами, является причиной понижения норадреналина и повышения серотонина в гипоталамусе, отмеченная в предыдущих опытах при парентеральном введении ГАМК (1).

Институт биохимии Академии наук
Армянской ССР

Հայկական ՍՍՀ ԳԱ ակադեմիկոս Հ. Խ. ԲՈՒՆՅԱԹՅԱՆ, Ն. Հ. ՆՍԱՅԱՆ, Ա. Ռ. ԱՐՄԵՆՅԱՆ

Գամմա-ամինոկարգաթթվի թափանցումը արյուն-ուղեղային պատնեշով

Մեր նախկին փորձերի արդյունքները ցույց են տվել, որ գամմա-ամինոկարգաթթվի (ԳԱԿԹ) փոքր քանակների ներորովայնային և ներկարոտիդային ներարկումները փոփոխում են նորադրենալինի և սերոտոնինի մակարդակը ուղեղում, հատկապես, միջին ուղեղում: Նման փոփոխություններ նկատվել էին նաև ուղեղային հյուսվածքի վրա ԳԱԿԹ-ի (30—300 մկգ/մլ) անմիջական ավելացման ժամանակ ամինաօքսիքացախաթթվի ազդեցության տակ: Սույն աշխատանքում ուսումնասիրվել է ԳԱԿԹ-ի ազատ և կապված ձևերի քանակական փոփոխությունները ուղեղի տարբեր մասերում: Փորձերի արդյունքները ցույց տվեցին, որ ԳԱԿԹ-ի ներորովայնային ներարկումը բերում է ազատ ԳԱԿԹ-ի հավանական բարձրացում հիպոթալամուսի առաջնային հատվածում: ԳԱԿԹ-ի (0,5 մկգ/կգ) ներկարոտիդային ներարկման դեպքում այդ բարձրացման հետ միասին նկատվել է ազատ ԳԱԿԹ-ի իջեցում կիսազնդերի կեղևում: Հավանական է, որ վերը նկարագրած նորադրենալինի և սերոտոնինի մակարդակների փոփոխությունը միջին ուղեղում ԳԱԿԹ-ի ազդեցության տակ կապված է հիպոթալամուսում ԳԱԿԹ-ի ազատ ֆիզիոլոգիական ակտիվ ձևի շատացման հետ:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Գ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

1 Н. А. Есаян, А. Р. Арменян, Л. Н. Аракелян, Вопросы биохимии мозга, 3, 313, 1967. 2 P. Strassberg, K. Krnjevic, S. Swartz and K. A. C. Elliott, J. Neurochem., 14, 755 (1967). 3 С. А. Мурзоян и Р. Г. Бороян, Вопросы биохимии мозга, 3, 117, (1967). 4 К. А. С. Elliott and N. N. Van Gelder, J. Physiol., 153, 423 (1960). 5 К. А. С. Elliott, R. T. Khan, B. Bilodeau and R. A. Lovell, Canad. J. Biochem., 43, 407.

(1965). ⁶ *H. Weinstein, E. Roberts and T. Kakefuda, Biochem. Pharmacol., 12, 503*
(1963). ⁷ *Б. А. Казарян, Э. А. Гулян, Вопросы биохимии мозга, 3, 83, 1967.* ⁸ *I. P. Lowe, E. Robins and G. S. Eyerman, J. Neurochem., 3, 8 (1958).* ⁹ *J. S. Sunita and C. Z. Malhotra, J. Neurochem., 9, 37 (1962).* ¹⁰ *R. E. Shaw and J. D. Heine, J. Neurochem., 12, 151 (1965).* ¹¹ *W. Lichtensteiger and H. Langemann, J. Pharmacol., 151, 400 (1966).* ¹² *A. Bertler, Acta Physiol. Scand., 51, 97 (1961).* ¹³ *Ch. Owman and B. Falck, Second Int. Pharm. Meeting, vol. 3, 157 (1965).*