

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О. В. ПАЛЛАДИНА

На правах рукопису

ТИШЕНКО ДМИТРО ВОЛОДИМИРОВИЧ

РОЗПОСІЛ [I-¹⁴C] ГАММА-АМІНОМАСЛЯНОЇ КИСЛОТИ
ТА ЇЇ КОН'ЮГАТІВ З ДЕЯКИМИ ВІТАМІНАМИ ГРУПИ В
У НЕЙРОСТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ
ПРИ ДІЇ ФАКТОРІВ ЗАМКНЕНОГО ПРОСТОРУ

03.00.04 - Біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1993

Робота виконана на кафедрі біохімії Одеського державного
університету ім. Г. Г. Мечникова

Науковий керівник — доктор медичних наук, професор
РОЗАНОВ А. Я.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
ХМЕЛЕВСЬКИЙ І. В.

доктор біологічних наук
ПАРХОМЕНКО Л. М.

Провідна установа — Харківський державний університет
ім. О. М. Горького

Захист відбудеться "27" чудна 1993 року
о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради
Д 016.07.01 в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна АН України
/252 601 м. Київ-30, вул. Леонтовича, 9/.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту
біохімії ім. О. В. Палладіна АН України

Автореферат розісланий "26" листопада 1993 року

Вчений секретар спеціалізованої ради
кандидат біологічних наук *Кирсенко* КИРСЕНКО О. В.

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

ЛНБ України ім. В. Стефаніка



00802368 (R)

ВСТУП

Актуальність теми. Гамма-аміномасляна кислота /ГАМК/, головний гальмівний медіатор у синапсах центральної нервової системи, проникає у мозок при парентеральному введенні в дуже незначних кількостях. Перші спроби збільшити проникність гематоенцефалічного бар'єра /ГЕБ/ для ГАМК шляхом її хімічного зв'язування з вітамінами були зроблені в Одеському медичному інституті ім. М.І.Пирогова проф. Я.Б.Максимовичем, який запропонував препарат "нікогам", що являє собою ГАМК, ковалентно пов'язану через аміну групу з нікотинатом /Максимович Я.Б., 1983/. У подальшому в нашій лабораторії були синтезовані радіоактивні препарати цієї речовини, мічені як у нікотиновій, так і в амінокислотній частині. Було встановлено, що ця сполука проникає через ГЕБ на порядок інтенсивніше, ніж вільна ГАМК /Розанов А.Я. та ін., 1989/. У зв'язку з цим викликає великий інтерес можливість поліпшення надходження ГАМК у нейроцити шляхом її кон'югації з іншими вітамінами групи В /піридоксаль-5'-фосфатом, біотином та ін./, а також більш глибоке вивчення проникності ніктоноіл-ГАМК у окремі нейроструктури головного мозку.

Мета і завдання досліджень. Головною метою нашої роботи було вивчення фармакокінетики, проникності через ГЕБ, поглинання нейроструктурами, а також катаболізму вільної ГАМК та її кон'югатів з ПАДФ, нікотинатом і біотином у нормальних умовах і при дії факторів замкненого простору.

Для досягнення цієї мети необхідно було вирішити такі завдання:

1/ порівняти швидкість проникнення зазначених сполук /ГАМК, ПАДФ-ГАМК, ніктоноіл-ГАМК і біотиніл-ГАМК/ через ГЕБ і, головне, швидкість їх надходження до окремих нейроструктур головного мозку /кора великих півкуль, кінхові дуговинці, гіпокамп, гіпоталамус, таламус, стріопалідум, ніжні мозку, мозочок, Варолів міст, довгастий мозок/, вивчити вплив факторів замкненого простору на цей процес;

2/ порівняти інтенсивність поглинання вивчених сполук нейроструктурами /зрізаних кори головного мозку, синапсами/ *in vitro*, вивчити вплив змісту кисню в інкубаційному середовищі на це поглинання;

3/ дослідити накопичення в різних органах і тканинах при парентеральному введенні, а також метаболічну деградацію в них ГАМК та її кон'югатів з вітамінами.

Наукова новизна. Вперше вивчена проникність нікотиноіл-ГАМК у окремі нейроструктури головного мозку, а також у гіпофіз. Вперше досліджені фармакокінетика і метаболізм до ^{14}C ПАЛФ- ^{14}C ГАМК і біотиніл- ^{14}C ГАМК. Вперше вивчений вплив факторів замкненого простору на розподіл у різних відділах центральної нервової системи, а також у деяких інших органах і тканинах ^{14}C ГАМК та її кон'югатів з вітамінами. Вперше досліджене поглинання ПАЛФ- ^{14}C ГАМК, нікотиноіл- ^{14}C ГАМК і біотиніл- ^{14}C ГАМК зрізами кори головного мозку та синапсосомами, а також вплив вмісту кисню в інкубаційному середовищі на цей процес.

Теоретичне і практичне значення. Наші дослідження підтверджують перспективність використання нікотиноіл-ГАМК як нейротропного препарату, бо ця речовина інтенсивніше у порівнянні з ГАМК проникає через ГЕБ і до того ж у дуже незначній кількості трансформується до вихідних сполук. ПАЛФ-ГАМК і біотиніл-ГАМК є у цьому відношенні менш ефективними, проте ПАЛФ-ГАМК характеризується більш виразною компенсаторною дією при гіпоксії, інтенсивніше зв'язується білками крові, активніше надходить до нейронів з позаклітинного середовища та швидше залучається до реакцій ГАМК-шунта у порівнянні з ГАМК.

Теоретичне значення роботи полягає у вивченні розподілу ГАМК та її кон'югатів з вітамінами в різних відділах головного мозку при парентеральному введенні, а також поглинання досліджуваних речовин нейроструктурами на різних рівнях організації /зрізи кори головного мозку, синапсосома/, впливу забезпеченості киснем та віку тварин на зазначені процеси. Результати роботи свідчать про специфічну фармакологічну дію нікотиноіл-ГАМК, в той час як ПАЛФ-ГАМК таку дію не справляє.

Апробація роботи. Результати роботи були викладені на XIII /1989 р./ і XIV /1993 р./ звітних наукових конференціях професорсько-викладацького складу та наукових співробітників ОДУ ім. І.І. Мечникова, на науковій конференції молодих вчених біологічного факультету ОДУ /1988 р./, на У Всесоюзному з'їзді геронтологів і геріатрів /м.Тбілісі, 1988 р./, на конференції "Пічамілон - новий цереброваскулярний та ноотропний препарат" /м.Уфа, 1989 р./. За результатами роботи опубліковані 2 статті в наукових зупналах.

Обсяг роботи. Дисертація викладена на 207 сторінках, містить 55 малюнків і 13 таблиць. Робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, 4 глав власних досліджень, обговорення отриманих результатів, висновків і списку використаних джерел /224 праці, з них 67 — західноєвропейськими мовами/.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У роботі були використані препарат міченої за карбоксильною групою [^{14}C] ГАМК фірми "Amersham" /Великобританія/ та синтезовані доцентом кафедри біохімії ОДУ А.В.Запорожченко за методикою проф. В.М.Копалевича /м.Москва/ препарати ПАДФ-[^{14}C] ГАМК, нікотиніла - [^{14}C] ГАМК і біотиніла - [^{14}C] ГАМК.

У дослідах з білками мишами /самці віком 2-4 місяці/ ПАДФ-[^{14}C] ГАМК і біотиніла - [^{14}C] ГАМК вводили відповідно підшкірно та внутрішньом'язово паралельно з [^{14}C] ГАМК у дозі 15 нмоль/г. Після ін'єкції тварин вмішували до камери, з'єднаної з сечоприймальником. Поглинання видихуваного $^{14}\text{CO}_2$ збільшувала, пропускаючи повітря з камери за допомогою компресора через дві послідовно розташовані склянки з QSO і NaOH . Радіоактивний вуглець карбоксатів сечі парували у $^{14}\text{CO}_2$ додаванням надлишку 10%-ної HCl і фіксували, пропускаючи повітря з сечоприймальника через такі ж склянки з лугом на протязі 10 хв. Мишей декапітували через 7,5, 15, 30, 60, 120 і 240 хв після початку експерименту. Морським свинкам /самці віком 2 місяці/ за 40 хв до декапітації вводили підшкірно [^{14}C] ГАМК або її кон'югати з ПАДФ, нікотинатом чи біотином у дозі 50 нмоль/г, після чого дослідних тварин, на відміну від контрольних, вмішували до герметично замкненої посудини місткістю 1 л. Гіпофіз і дрібні структури мозку розмішували без гомогенізації на завчасно зважених мішенях разом з 0,5 мл 0,01 н розчину NaOH , у інших випадках готували гомогенати тварин на цьому ж розчині з об'ємному співвідношенні 1:10 та наносили по 0,5 мл на мішені поруч із розведеною з 10 разів кров'ю, суспензією змісту різних відділів шлунково-кишкового тракту у відношенні 1:80 та рідинами, що містять мічений вуглець видихуваного повітря або сечі. Зразки висушували до постійної маси. Радіоактивність визначали на газопроточному лічильнику 2154-І-ІМ /"Протока"/. Розраховували питомий вміст радіоактивного вуглецю /у нмоль/г сухої тканини/, дозу накопичення мітки у звичених органах, а також у сечі та видихуваному повітрі /у % від усієї введеної

доза/ та відносну радіоактивність, тобто відношення радіоактивності І г досліджуваної тканини до відповідної величини на І г маси тварини.

Для вивчення поглинання згаданих речовин нейроструктурами *in vitro* використовували самок білих щурів. Техніка приготування зрізів тим'яної кори товщиною 300 мкм /по 60-80 мг на пробу/, а також склад інкубаційного середовища не відрізнялися від описаних В.А.Розановим та ін. /1991/. Після преінкубації на протязі 1,5 год при температурі 37°C і безперервній аерації до середовища додавали мічені субстрати у остаточній концентрації 2-256 мМ та інкубували 10 хв з аерацією або без неї. Потім зрізи промивали у вільній від ізотопа інкубаційній рідині та гомогенізували у 4 мл 0,01 н розчину NaOH, по 0,5 мл гомогенатів наносили на мішені для визначення радіоактивності. Результати поглинання мічених ополук виражали у вмісті за 1 хв інкубації на 1 г зрізів або на 1 мл тканинної води, приймаючи вміст останньої за 80% від загальної маси зрізу.

Фракцію "грубих" синапсом, що містить домішку легких мітохондрій, добували, використовуючи загальноприйняті методи /Методи біохімічних досліджень..., 1982/. До 0,2 мл суспензії "грубих" синапсом у середовищі Габлера додавали 0,1 мл розчину досліджуваних мічених препаратів у відповідній концентрації. Після певного часу інкубації при 37°C до суміші швидко /за 1-2 с/ вливали 4,7 мл охолодженого середовища Габлера та центрифугували при 0 - шіву 4°C на протязі 10 хв при 15000 г, потім промивали за тих же умов. Осад розчиняли у 2 мл 0,01 н NaOH і по 0,5 мл наносили на мішені. Білок визначали біуретовим методом. Результати виражали у вмісті мічених препаратів та І г білка фракції "грубих" синапсом.

При визначенні процента зв'язування [^{14}C] ГАМК і ПАЛФ- [^{14}C] ГАМК білками крові фракції плазми та клітинних елементів доводили до західного об'єму крові фізрозчином. До кожної проби зносили з 0,1 мл цього ж розчину 15 вмілей одного з досліджуваних мічених препаратів. Через 15, 30, 45 або 60 хв інкубації при 37°C у кожній з проб осаджали білки додаванням 4-кратного об'єму абсолютного спирту, осад відділяли центрифугуванням на протязі 5 хв при 9000 г, розчиняли у 5 мл 0,01 н NaOH і по 0,5 мл наносили на мішені.

При дослідженні катаболізму [^{14}C] ГАМК і ПАЛФ- [^{14}C] ГАМК *in vitro* застосовували фіксацію $^{14}\text{CO}_2$, що утворюється при інку-

бації 300 вмість мічених препаратів на протязі I год при 37°C з I мн гомогенатів мозку, печінки або слизової кишечника у відношенні 1:4, на фільтрі, змоченім 0,05 мл I мн NaOH /Розанов В.А. в др.; 1990/.

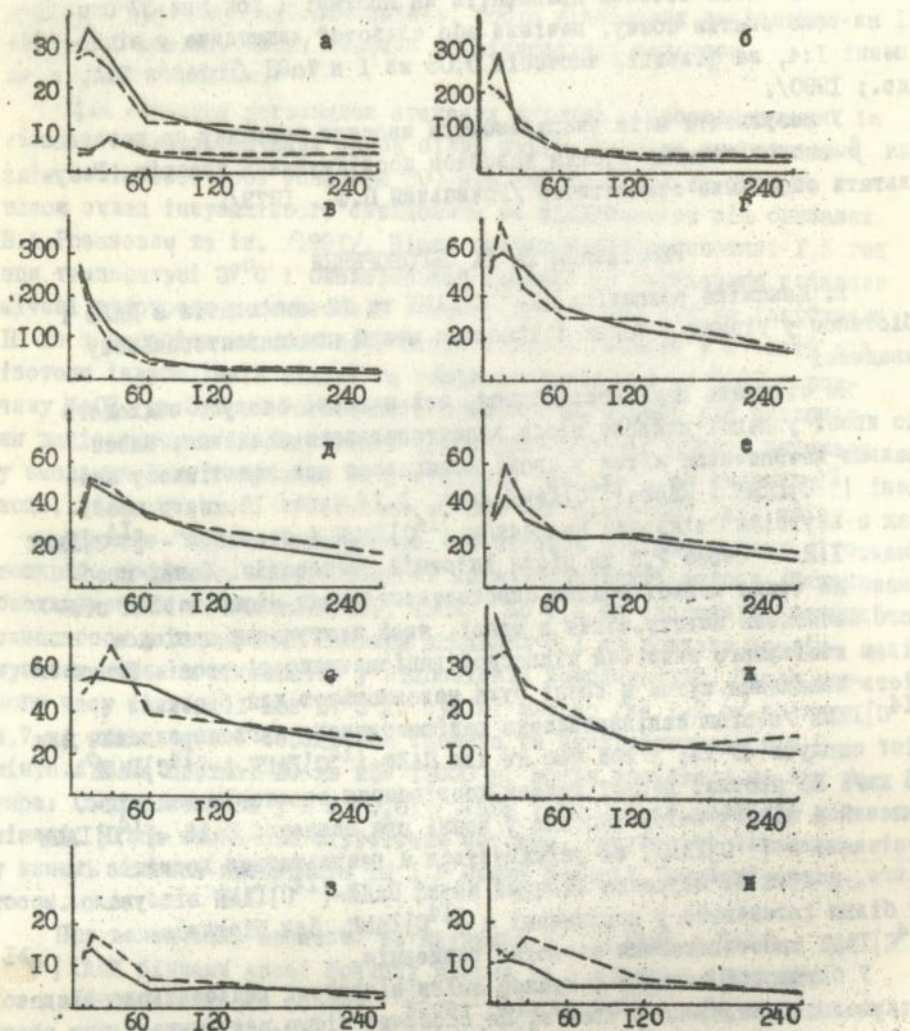
У результаті всіх експериментів вносили поправку на поглинання β -випромінювання густим шаром досліджуваних зразків. Результати обробляли статистично /Розицький П.Ф., 1973/.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

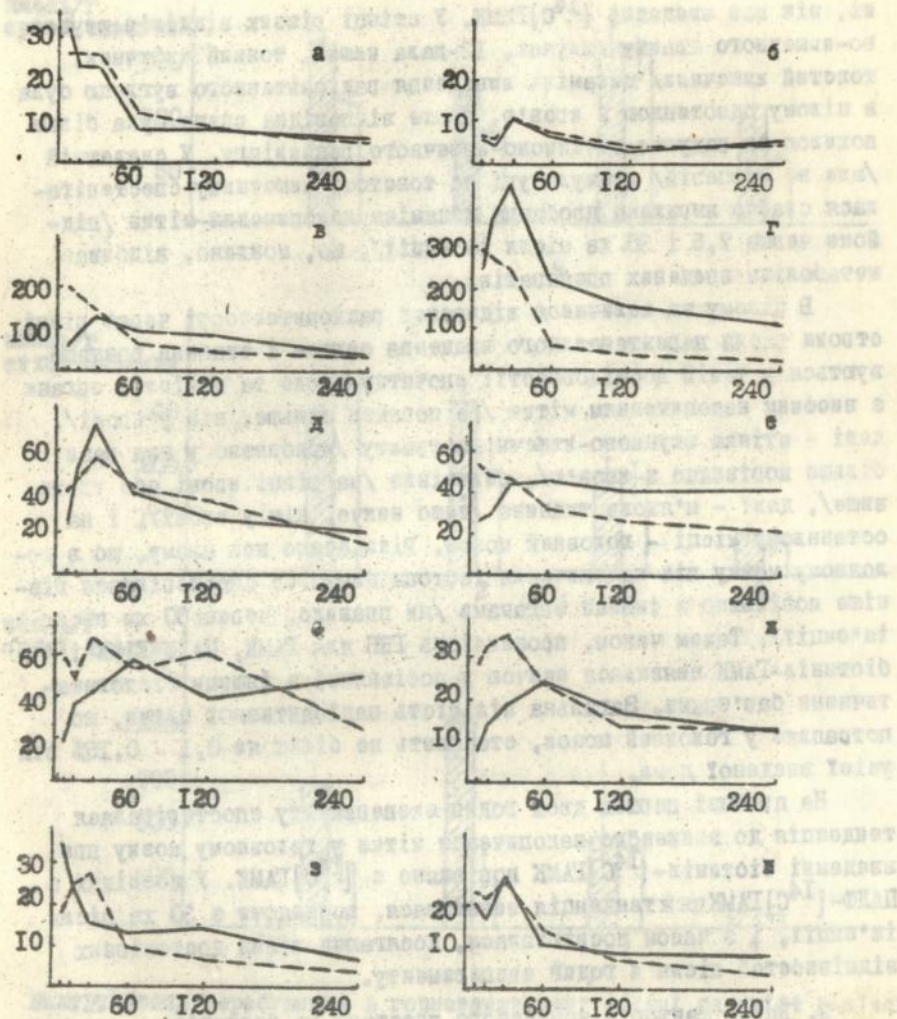
I. Динаміка розподілу $[I-^{14}C]$ ГАМК та її кон'югатів з ПАЛФ і біотином у різних органах і тканинах шийки при парентеральному введенні

Як свідчать наші дослідження, всі звичені сполуки надходять до крові у перші хвилини після парентерального введення. Максимальне накопичення мітки у крові досягалося при підшкірному введенні $[^{14}C]$ ГАМК і ПАЛФ- $[^{14}C]$ ГАМК /мал. I.1/ через 15 хв, у дослідках з внутрішньом'язовим введенням $[^{14}C]$ ГАМК і біотиніл - $[^{14}C]$ ГАМК /мал. I.2/ - через 7,5 хв після ін'єкції препаратів. Далі, приблизно до кінця першої години спостереження, мав місце період різкого зменшення вмісту мітки в крові, який заступався періодом більш повільного зниження відносної радіоактивності крові. Швидкість звведення мітки з крові була максимальною для біотинілу - $[^{14}C]$ ГАМК /період напівзведення радіоактивного вуглецю складав для цієї сполуки 40 хв, у той час як для ПАЛФ- $[^{14}C]$ ГАМК і $[^{14}C]$ ГАМК - 55 хв/. На протязі першої години дослідження спостерігався підвищений в цілому вміст ізотопу у крові при введенні ПАЛФ- $[^{14}C]$ ГАМК порівняно з $[^{14}C]$ ГАМК, що узгоджується з результатами дослідів *in vitro*, в яких зв'язування білками крові ПАЛФ- $[^{14}C]$ ГАМК відбувалося більш інтенсивно у порівнянні з $[^{14}C]$ ГАМК. Для біотинілу- $[^{14}C]$ ГАМК спостерігалася зворотна тенденція.

У більшості органів і тканин зміни відносної радіоактивності відбувалися синхронно з кров'ю. Це особливо чітко виявляється для печінки, селезінки, серця. У нирках крива звведення мітки мала більш виразний експоненціальний характер порівняно з кров'ю, що свідчить про слабку інтенсивність метаболізму досліджуваних сполук у цій тканині. При введенні біотинілу- $[^{14}C]$ ГАМК максимум накопичення мітки у печінці та нирках спостерігався пізніше у порівнянні з $[^{14}C]$ ГАМК /через 30 хв, а не через 7,5 хв/, і вміст ізотопу заввишався до самого кінця експерименту на більш високому рівні.



Мал. 1. Відносна радіоактивність крові /а, вгорі/, мозку /а, внизу/, печінки /б/, нирок /в/, шлунка /г/, 12-палої кишки /д/, тонкого /е/ та товстого /є/ кишечника, серцевої /з/ і скелетної /и/ мускулатури та селезінки /к/ м'язи через різні строки після підкірнього введення ПААЛ-2-[1-¹⁴С]ГАМК / — / і [1-¹⁴С]ГАМК / - - - / у дозі 15 мікромоль/г. По вісі ординат - відносна радіоактивність, по вісі абсцис - час після ін'єкції /у хвилинах/



Нам. 2. Відносна радіоактивність крові /а/, мозку /б/, печінки /в/, нирок /г/, 12-палеї кишки /д/, тонкого /е/ та товстого /є/ кишечника, селезінки /з/, серцевої /з/ та скелетної /и/ мускулатури мишею через різні строки після внутрішньом'язового введення біотинід-[I-¹⁴C]ГАНК / — / і [I-¹⁴C]ГАНК / - - / у дозі 15 мг/кг. По вісі ординат - відносна радіоактивність, по вісі абсцис - час після ін'єкції /у хвилинах/

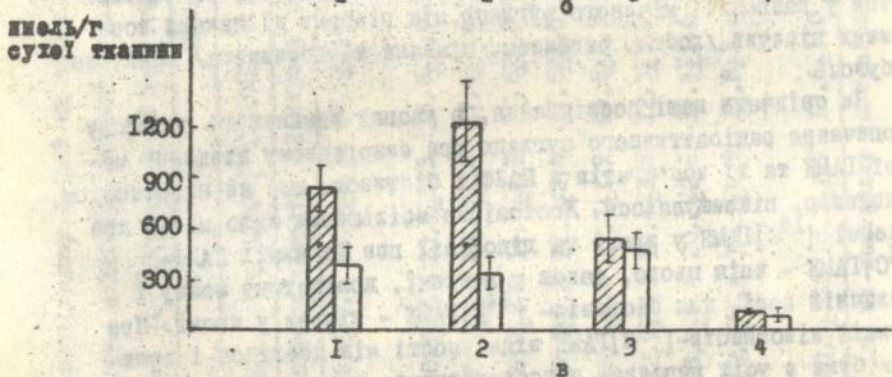
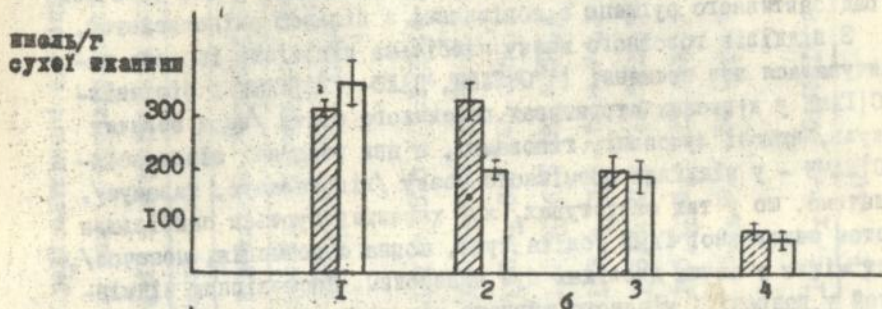
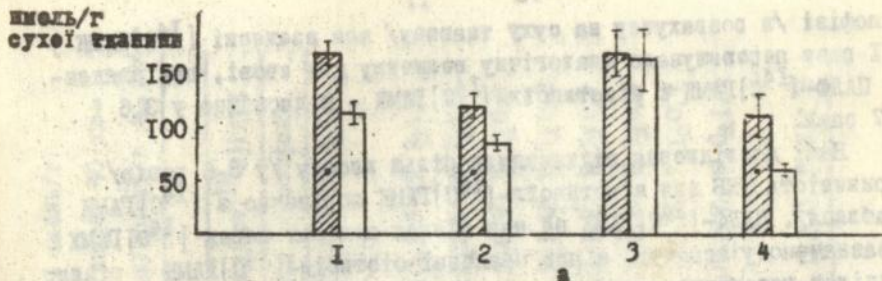
ні, ніж при введенні $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$. У стінці різних відділів шлунково-кишкового тракту /шлунок, 12-пала кишка, тонкий кишечник, товстий кишечник/ динаміка виведення радіоактивного вуглецю була в цілому однотипною з кров'ю, проте відповідна крива була більш похилою за рахунок печінково-кишкового рециклінгу. У скелетній /але не серцевій/ мускулатурі та товстому кишечнику спостерігалася слабо виражена двофазна динаміка накопичення мітки /підйоми через 7,5 і 30 хв після ін'єкції/, що, можливо, відбиває метаболізм введених препаратів.

В цілому за величиною відносною радіоактивності через різні строки після парентерального введення органи і тканини розташовуються у такій послідовності: спочатку нирки та печінка, органи з високим накопиченням мітки /на порядок більше, ніж у крові/, далі - стінка шлунково-кишкового тракту /приблизно у два рази більше порівняно з кров'ю/, селезінка /на рівні крові або трохи вище/, далі - м'язова тканина /дещо вище, ніж у крові/, і на останньому місці - головний мозок. Відзначимо при цьому, що в головному мозку пів накопичення ізотопу звичайно спостерігався пізніше порівняно з іншими органами /як правило, через 30 хв після ін'єкції/. Таким чином, провідність ГЕБ для ГАМК, ПАЛФ-ГАМК і біотиніл-ГАМК виявилася вищою у порівнянні з іншими гістогема-тичними бар'єрами. Загальна кількість радіоактивної мітки, що потрапляє у головний мозок, становить не більш як 0,1 - 0,15% від усієї введеної дози.

На протязі перших двох годин експерименту спостерігалася тенденція до зниженого накопичення мітки у головному мозку при введенні біотиніл- $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ порівняно з $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$. У досліджах з ПАЛФ- $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ ця тенденція виявлялася, починаючи з 30 хв після ін'єкції, і з часом посилювалася, досягаючи рівня достовірних відмінностей після 4 годин експерименту.

2. Вплив факторів замкненого простору на розподіл $[I-^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ та її кон'югатів з ПАЛФ, нікотинатом і біотином у різних відділах головного мозку та у деяких інших органах і тканинах морських свинок

Через 40 хв після підшкірного введення $[I-^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ у дозі 50 нмоль/г самцям морських свинок найбільш високе накопичення мітки спостерігалася у печінці, при ін'єкції ефімолярних кількостей ПАЛФ- $[I-^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$, нікотиноіл- $[I-^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ і біотиніл- $[I-^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ - у гіпофізі /мал. 2.1/. Питоме накопичення мітки у



Нам: 2. Вплив перебування в герметизованому об'ємі на вміст радіоактивного вуглецю в крові /а/, печінці /б/ та гіпофізі /в/ морських свиней через 40 хв після підшкірного введення $[I-^{14}C]GAMK$ /1/, ПЛФ- $[I-^{14}C]GAMK$ /2/, нікотиніл- $[I-^{14}C]GAMK$ /3/ і біотиніл- $[I-^{14}C]GAMK$ /4/ у дозі 50 нмоль/г. Крапками позначені достовірні відмінності між дослідом /ліві стовпчики/ та контролем /праві стовпчики/ ($n=10$).

гіпофізі /в розрахунку на суху тканину/ при введенні $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ у 3,1 рази перевищувало аналогічну величину для крові, при введенні ПАЛФ- $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ і нікотиноїл- $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ - відповідно у 3,6 і 2,7 рази.

Наші дослідження підтвердили більш високу /у 5-6 разів/ проникність ГЕБ для нікотиноїл- $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ порівняно з $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ /таблиця/. ПАЛФ- $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ не мав ніяких переваг перед $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ у зазначеному аспекті, а при введенні біотиніл- $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ у різних відділах головного мозку накопичувалося, навпаки, у 2-3 рази менше радіоактивного вуглецю в порівнянні з вільною амінокислотою.

З відділів головного мозку найбільша кількість ізотопу накопичувалася при введенні $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$, ПАЛФ- $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ і біотиніл- $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ у кіркових структурах переднього мозку /кора великих півкуль, нюхові луковичі, гіпокамп/, а при введенні нікотиноїл- $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ - у відділах проміжного мозку /гіпоталамус, таламус/. Зазначимо, що у тих структурах, які характеризуються найбільшим вмістом ендогенної ГАМК /бліда куля, чорна субстанція, мозочок/, вміст мітки у наших дослідах був невисоким. Достовірних відмінностей у розподілі міченого вуглецю між різними ділянками кори великих півкуль /лобна, скронева, тім'яна та потилична/ знайдено не було.

Як свідчать наші дослідження, в умовах замкненого простору накопичення радіоактивного вуглецю при екзогенному введенні міченої ГАМК та її кон'югатів з ПАЛФ і біотином, але не нікотинатом, як правило, підвищувалося. Достовірне збільшення мало місце при введенні $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ у крові та гіпофізі, при ін'єкції ПАЛФ- $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ - крім цього, також у нечінці, довгастому мозку і потиличній корі, для біотиніл- $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ - тільки у крові. При ін'єкції нікотиноїл- $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ відмінності між дослідом і контролем були в усіх випадках недостовірними, хоча в цілому і для цієї сполуки переважала тенденція до підвищеного накопичення мітки в умовах дії факторів замкненого простору.

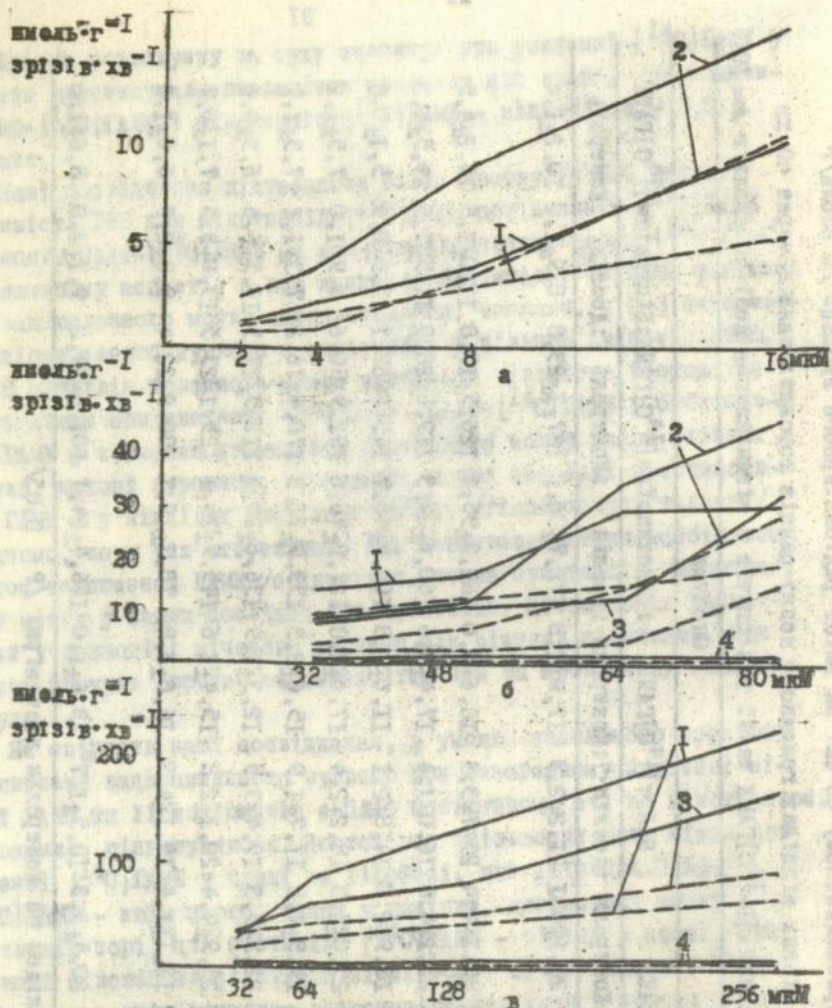
3. Поглинання $[I-^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ та її кон'югатів з ПАЛФ, нікотинатом і біотином зрізми кори головного мозку та синаптосомами.

Дослідження зрізів/мал. 3.1/ свідчать про активний /проти градієнта концентрації/ характер поглинання $[I-^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$, ПАЛФ- $[I-^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ і нікотиноїл- $[I-^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ при їх вмісті в інкубаційному середовищі 2 - 256 мМ. Відношення концентрації мітки тваринна вода /інкубаційне середовище складало при цьому від 2,5 до

Вплив перебування в герметизованому об'ємі на вміст радіоактивного вуглецю /в нмоль/г сухої ваги тканини/ у різних відділах головного мозку самців морських свинок через 40 хв після підшкірного введення $[1-^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ та її кон'югатів з вітамінами в дозі 50 нмоль/г $n=10$.

Відділи мозку	Сполуки							
	$[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$		ПАЛФ= $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$		Нікотикоїл= $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$		Біотиніл= $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$	
	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль
Неокортекс	26,1 \pm 5,3	26,2 \pm 4,1	21,2 \pm 2,3	17,9 \pm 1,8	177,7 \pm 36,0	127,1 \pm 23,8	8,9 \pm 1,2	10,2 \pm 1,4
Пихві								
Луковиці	27,7 \pm 5,2	30,1 \pm 4,4	23,7 \pm 3,3	16,6 \pm 2,0	161,3 \pm 35,3	126,5 \pm 15,8	11,0 \pm 1,5	15,2 \pm 4,5
Гіпокамп	26,9 \pm 6,8	28,2 \pm 4,8	16,0 \pm 1,4	17,4 \pm 3,6	160,6 \pm 24,3	119,8 \pm 28,9	11,5 \pm 5,5	14,5 \pm 4,3
Стріопалідум	18,5 \pm 3,8	16,9 \pm 2,0	14,8 \pm 2,1	11,6 \pm 1,8	108,4 \pm 48,7	145,0 \pm 67,1	5,3 \pm 0,9	5,1 \pm 0,8
Гіпоталамус	24,4 \pm 3,3	25,0 \pm 5,3	18,2 \pm 2,4	17,6 \pm 2,8	127,9 \pm 46,6	192,9 \pm 50,6	6,9 \pm 1,0	7,5 \pm 1,2
Таламус	26,8 \pm 4,6	19,3 \pm 4,8	17,7 \pm 1,9	15,6 \pm 2,3	133,9 \pm 31,3	170,4 \pm 76,2	7,3 \pm 1,1	7,3 \pm 1,9
Ніжки мозку	22,4 \pm 5,7	22,5 \pm 5,3	19,4 \pm 3,5	12,3 \pm 1,9	136,6 \pm 20,1	112,5 \pm 17,3	13,5 \pm 6,6	6,3 \pm 0,6
Мозочок	27,3 \pm 4,2	23,9 \pm 4,4	20,1 \pm 2,8	15,4 \pm 1,6	145,5 \pm 26,1	123,1 \pm 23,5	13,0 \pm 3,5	7,1 \pm 0,7
Варолієв міст	14,5 \pm 1,2	12,1 \pm 1,4	19,1 \pm 4,9	16,8 \pm 3,8	78,1 \pm 19,7	80,9 \pm 22,4	9,8 \pm 2,7	6,0 \pm 1,9
Довгастий мозок	25,2 \pm 3,9	20,5 \pm 3,3	18,5 \pm 1,7 ^{##}	13,6 \pm 1,0	146,4 \pm 24,1	101,6 \pm 14,2	9,1 \pm 2,0	8,6 \pm 1,0

^{##} Відмінності між дослідом та контролем достовірні /P < 0,05/



Мал. 3. Включення зрізми кори великих пічкуль головного мозку 8-12-місячних /а, в/ та 2-місячних /б/ самок щурів $[\text{I-}^{14}\text{C}]\text{ГАНК}$ /1/, ПАНЗ- $[\text{I-}^{14}\text{C}]\text{ГАНК}$ /2/, нікотиніол- $[\text{I-}^{14}\text{C}]\text{ГАНК}$ /3/ і біотиніл- $[\text{I-}^{14}\text{C}]\text{ГАНК}$ /4/ у нормальних / — / та гіпеконічних / - - - / умовах інкубації

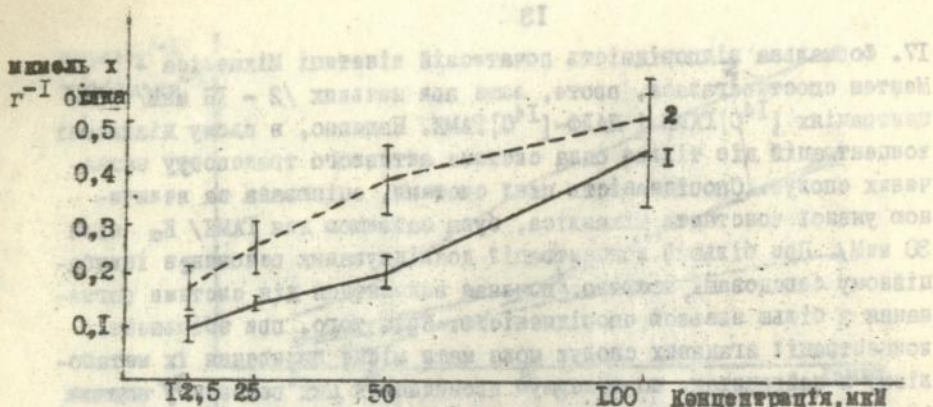
17. Формальна відповідність початковій кінетиці Міхаеліса - Ментен спостерігалася, проте, лише при низьких /2 - 16 мМ/ концентраціях [^{14}C]ГАМК і ПАДФ- ^{14}C]ГАМК. Напевно, в цьому діапазоні концентрацій діє тільки одна система активного транспорту зазначених сполук. Спорідненість цієї системи, оцінювана за величиною уявної константи Міхаеліса, була найвищою для ГАМК/ K_m біля 30 мМ/. При більшій концентрації досліджуваних речовин в інкубаційному середовищі, можливо, починає виявлятися дія системи поглинання з більш низькою спорідненістю. Крім того, при збільшенні концентрації згаданих сполук може мати місце посилення їх метаболізму в нейронах, що полегшує провищення цих речовин у нервові клітини шляхом пасивної дифузії.

Поглинання зрізами ПАДФ- ^{14}C]ГАМК у більшості випадків перевищувало відповідний показник для [^{14}C]ГАМК /достовірні відмінності спостерігалися при концентрації сполук 2 і 8 мМ/, а для нікотинної - ^{14}C]ГАМК тенденція була протилежною. Щодо біотинил- ^{14}C]ГАМК, поглинання зрізами кори головного мозку цієї сполуки було найвищим /на порядок менше порівняно з зільною амінокислотою/ і відбувалося шляхом пасивної дифузії, про що свідчать величина відношення титровання вода/інкубаційне середовище, менша за одиницю.

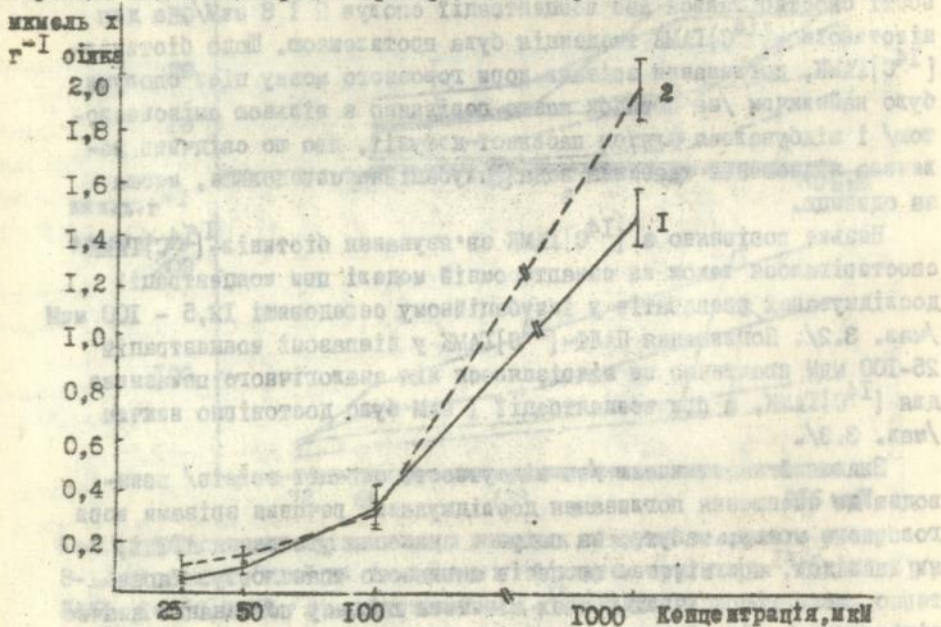
Низьке порівняно з [^{14}C]ГАМК зв'язування біотинил- ^{14}C]ГАМК спостерігалася також на синаптосомній моделі при концентрації досліджуваних препаратів у інкубаційному середовищі 12,5 - 100 мМ /мал. 3.2/. Поглинання ПАДФ- ^{14}C]ГАМК у діапазоні концентрацій 25-100 мМ практично не відрізнялося від аналогічного показника для [^{14}C]ГАМК, а при концентрації 1 мМ було достовірно вищим /мал. 3.3/.

Знижений вміст кисню /за відсутності аерації зрізів/ призводив до зменшення поглинання досліджуваних речовин зрізами кори головного мозку, мабуть, за рахунок зниження утворення АТФ і, як наслідок, притячення процесів активного транспорту. Характерно, що в гіпоксичних умовах кінетика процесу поглинання значно відхиляється від рівняння Міхаеліса, що відбуває збільшення в цих умовах ролі процесів пасивної дифузії.

При порівнянні 1-2-місячних і 8-12-місячних самок шурів виявилася, що з віком тварин здатність зрізів кори головного мозку до поглинання ГАМК та її кон'югатів з нікотинатом і біотином збільшується. Особливо інтенсивно зазначені відмінності виявля-



Нам. 3: Залежність зв'язування $[1-^{14}\text{C}]\text{ГАМК} /1/$ і $[1-^{14}\text{C}]\text{ГАМК} /2/$ "всечисленими" синапсами головного мозку щурів за 2 хв інкубації від концентрації препаратів в інкубаційному середовищі (n=10)



Нам. 3: Залежність зв'язування ПАО- $[1-^{14}\text{C}]\text{ГАМК} /1/$ і $[1-^{14}\text{C}]\text{ГАМК} /2/$ "всечисленими" синапсами головного мозку щурів за 2 хв інкубації від концентрації препаратів в інкубаційному середовищі (n=10)

лися для нікотинотіл- $[^{14}\text{C}]$ ГАМК /у деяких випадках різниця була 5- і навіть 10-кратно/, а також при інкубації зрізів у гіпоксичних умовах порівняно з нормоксичними. Отже, у мозковому зні самки шурів виявилися більш чутливими до гіпоксії, ніж у сабдавні репродуктивного періоду.

4. Катаболізм до $^{14}\text{CO}_2$ та динаміка виведення з організму мшеш $[I-^{14}\text{C}]$ ГАМК та її кон'югатів з вітамінами.

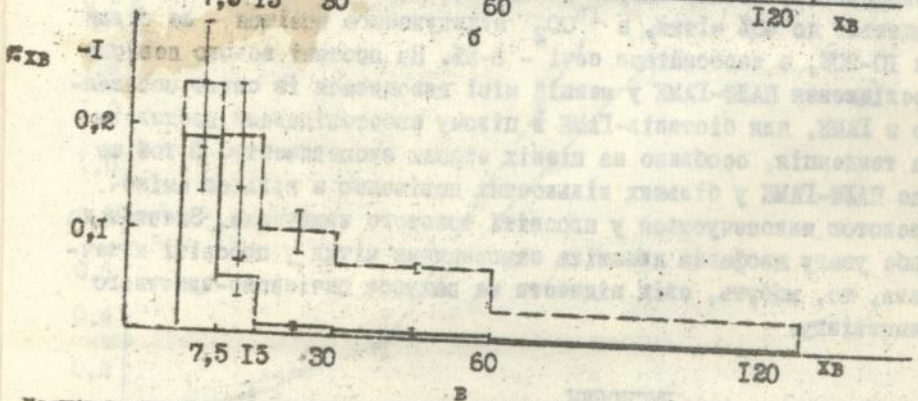
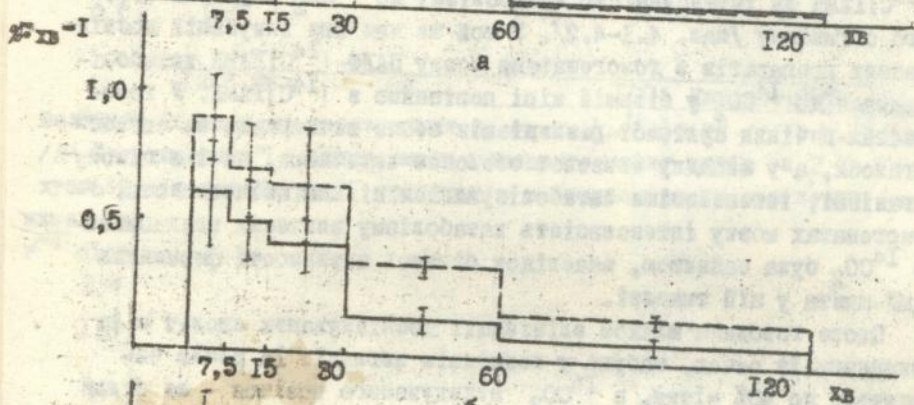
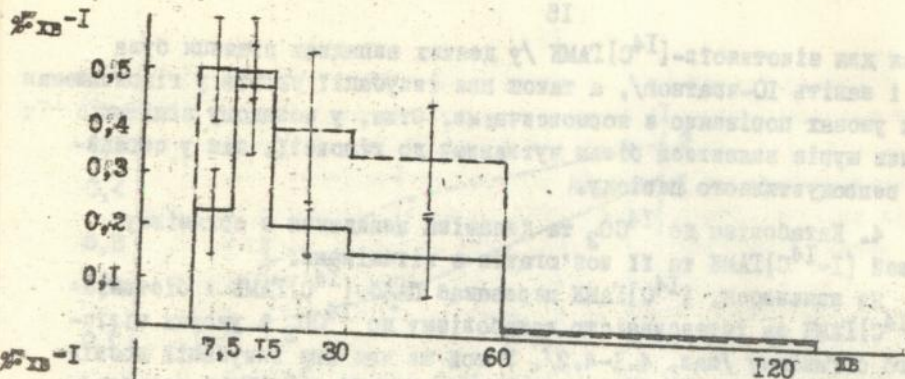
Як виявилось, $[^{14}\text{C}]$ ГАМК переважає ПАЛФ- $[^{14}\text{C}]$ ГАМК і біотиніл- $[^{14}\text{C}]$ ГАМК за інтенсивністю катаболізму до $^{14}\text{CO}_2$ в умовах цілісного організму /мал. 4.І-4.2/. У той же час при інкубації досліджуваних препаратів з гомогенатами мозку ПАЛФ- $[^{14}\text{C}]$ ГАМК катаболізувалася до $^{14}\text{CO}_2$ у більшій мірі порівняно з $[^{14}\text{C}]$ ГАМК. У гомогенатах печінки суттєвої різниці між обома речовинами не спостерігалось, а у випадку слизової оболонки шлунка, як і в цілому організмі, інтенсивніше катаболізувалася вільна амінокислота. У гомогенатах мозку інтенсивність катаболізму вчених препаратів до $^{14}\text{CO}_2$ була найвищою, внаслідок більшої активності ферментів ГАМК-шунта у цій тканині.

Проте головним шляхом елімінації досліджуваних сполук є їх виведення із сечев, мабуть у незмінній вигляді. Із сечев виводиться до 40% мітки, з $^{14}\text{CO}_2$ видихуваного повітря - не більш як 10-20%, з карбонатами сечі - 3-5%. На протязі всього періоду дослідження ПАЛФ-ГАМК у меншій мірі виводилася із сечев порівняно з ГАМК, для біотиніл-ГАМК в цілому спостерігалася протилежна тенденція, особливо на пізніх етапах експерименту. В той же час ПАЛФ-ГАМК у більших кількостях порівняно з вільною амінокислотою накопичується у просвіті товстого шлунка. Звертає на себе увагу дрофазна динаміка накопичення мітки у просвіті шлунка, що, мабуть, слід віднести за рахунок печінково-шлункового рециклінгу.

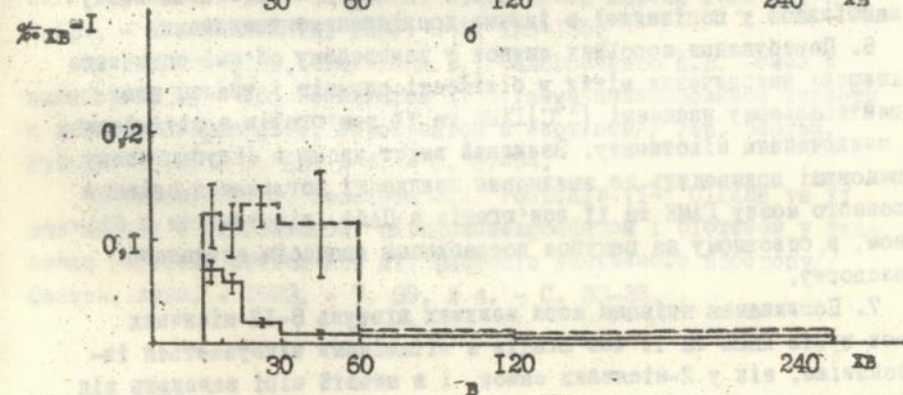
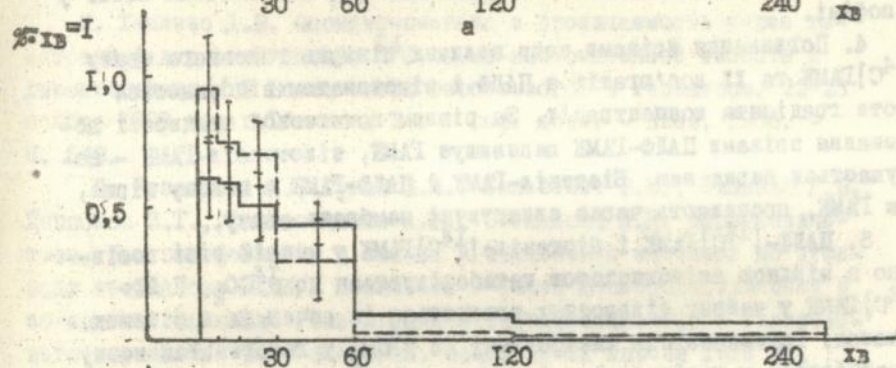
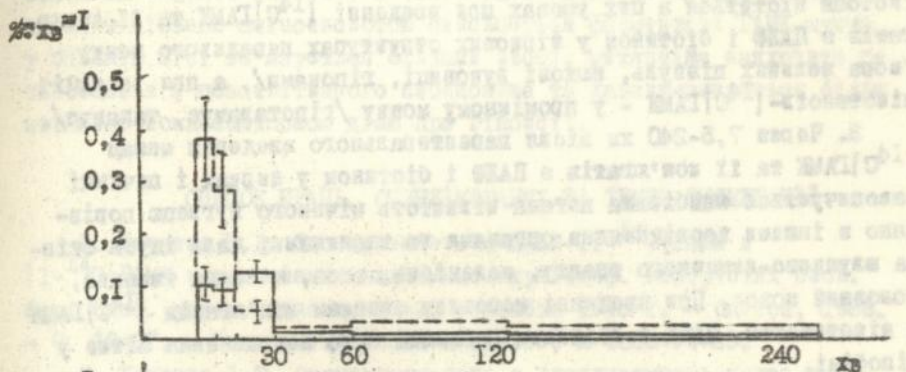
ВИСНОВКИ

1. Максимальний зміст мітки у крові досягається в перші хвилини після парентерального введення $[I-^{14}\text{C}]$ ГАМК та її кон'югатів з ПАЛФ і біотином. Період напівавиведення мітки становить для $[^{14}\text{C}]$ ГАМК і ПАЛФ- $[^{14}\text{C}]$ ГАМК 55 хв, для біотиніл- $[^{14}\text{C}]$ ГАМК - 40 хв.

2. Нікотинотіл- $[^{14}\text{C}]$ ГАМК через 40 хв після підшкірного вве-



Нам. 4: Г. Езидкітьсь виведення нітки з $I^{14}CO_2$ видихуваного повітря /а/, сечі /б/ та карбонатами сечі /в/ після підкірнього введення мшам ПЛАС- $[I-^{14}C]$ ГАНК / — — — / і $[I-^{14}C]$ ГАНК / - - - / у дозі 15 мкмоль/Г (n=10)



Мал. 4: 2. Швидкість виведення мітки з $I^{14}CO_2$ видихуваного повітря /а/, сечев /б/ та карбонатами сечі /в/ після внутрішнього введення мишам біотинілу- $[I-I^{14}C]РАМК$ / / - $[I-I^{14}C]РАМК$ / - - - / у дозі 15 мкмоль/г (n=10)

дення самцям морських свинок накопичується у мозковій тканині у 5-6 разів інтенсивніше порівняно з $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$. Найбільша кількість ізотопу міститься в цих умовах при введенні $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ та її кон'югатів з ПАЛФ і біотином у шірочних структурах переднього мозку /кора великих півкуль, вихові луковичі, гіпокамп/, а при ін'єкції нікотиноіл- $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ - у проміжному мозку /гіпоталамус, таламус/.

3. Через 7,5-240 хв після парантерального введення мишам $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ та її кон'югатів з ПАЛФ і біотином у нирках і печінці накопичується найбільша частина кількості міченого вуглецю порівняно з іншими досліджуваними органами та тканинами, далі ідуть стінка шлунково-кишкового тракту, селезінка, кров, м'язова тканина, головний мозок. При введенні морським свинкам кон'югатів $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ з нікотинатом, ПАЛФ і біотином найвищим було накопичення мітен у гіпофізі.

4. Поглинання зрізами кори великих півкуль головного мозку $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ та її кон'югатів з ПАЛФ і нікотинатом відбувається проти градієнта концентрації. За рівнем початкової швидкості поглинання зрізами ПАЛФ- $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ перевищує $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$, нікотиноіл- $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ - поступається перед ним. Біотиніл- $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ і ПАЛФ- $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ в цілому гірше, ніж $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$, проникають через синаптичні мембрани мозку.

5. ПАЛФ- $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ і біотиніл- $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ у меншій мірі порівняно з вільною амінокислотою катаболізуються до $^{14}\text{CO}_2$, ПАЛФ- $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ у менших кількостях виводиться із сечев та в більших - з калом. Інтенсивність катаболізму до $^{14}\text{CO}_2$ у гомогенатах мозку є найбільшою у порівнянні з іншими досліджуваними тканинами.

6. Перебування морських свинок у замкненому об'ємі спричинює підвищене накопичення мітен у більшості органів і тканин при парантеральному введенні $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ та її кон'югатів з вітамінами, за виключенням нікотинату. Знижений вміст кисню в інкубаційному середовищі призводить до зменшення швидкості поглинання зрізами головного мозку $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ та її кон'югатів з ПАЛФ, нікотинатом і біотином, в основному за рахунок послаблення процесів активного транспорту.

7. Поглинання зрізами кори великих півкуль 8-12-місячних самок мурів $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ та її кон'югатів з вітамінами відбувається інтенсивніше, ніж у 2-місячних самок, і в меншій мірі залежить від вмісту кисню в інкубаційному середовищі.

8. Найбільш перспективними для практичного використання з вивчених препаратів є нікотиноіл- $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$, яка інтенсивніше погли-

явно з ГАМК проникає через ГЕБ і лише у незначній мірі розпадається на вихідні сполуки, а також ПАЛФ-ГАМК, що швидше у порівнянні з вільною амінокислотою окислюється ферментами ГАМК-шунта, у більшій мірі зв'язується білками крові, активніше надходить до нейротців з позаклітинного середовища та характеризується більш виразною компенсаторною дією при гіпокоії.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Тищенко Д.В. Фармакокінетика ПАЛФ- $[I-^{14}C]$ ГАМК і $[I-^{14}C]$ ГАМК в організмі миші//Мат.науч.конф. мол.учених биол. фак. Одес. ун-та. Одесса, 22-23 сентября 1988 г. - Одесса, 1988. - С. 63-67. - Деп. в УкрНИИТИ 27.10.89, № 2308-Ук-89.
2. Тищенко Д.В. Фармакокінетика і проникність через гематоенцефалічний бар'єр $I^{14}C$ -гамма-аміномасляної кислоти в геронтогенезі// У Всес. съезд геронтологів і геріатрів. 22-25 листопада 1988 г., г.Тбілісі. Тез. в сбф. докл. - Киев, 1988. - С. 642.
3. Розанов А.Я., Гунар В.И., Копелевич В.М., Тищенко Д.В., Дерполов И.Г., Запорожченко А.В., Степанова Л.Н. Фармакокінетика, біотрансформація в тварях і катаболізм меченої по углероду нікотинної ГАМК// Пивамилон - новий цереброваскулярний і ноотропний препарат /результати експериментального і клінічного вивчення/: Тез. Всесоюз. конф. 19-21 апреля 1989 г., г.Уфа, - М.: ВНИИСЭТИ, 1989. - С. 126-135.
4. Розанов А.Я., Тищенко Д.В., Запорожченко А.В. Обмен і катаболізм до $I^{14}CO_2$ кон'югатів $[I^{14}C]$ гамма-аміномасляної кислоти з піридоксальфосфатом, нікотинатом і біотинном// Укр. біохім. журн. - 1993. - Т. 65, № 4. - С. 87-94.
5. Тищенко Д.В., Розанова З.А. Розподіл $[I-^{14}C]$ ГАМК та її кон'югатів з нікотинатом, піридоксальфосфатом і біотинном у тваринах морських свинок при дії факторів замкненого простору// Физиол. журн. - 1993. - Т. 39, № 4. - С. 33-38.

ИИ

1888. 243

1888. 243

AB28.643

AB 28.643