

Інститут ендокринології та обміну речовин  
ім. В.П. Комісаренка АМН України

На правах рукопису

МІШУНІНА Тамара Мар'янівна

РОЛЬ ГАМК-ЕРГІЧНИХ МЕХАНІЗМІВ У ВПЛИВІ ГОРМОНІВ СИСТЕМИ  
ГІПОТАЛАМУС-АДЕНОГІПОФІЗ-КОРА НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ НА МОЗОК  
ТА У РЕГУЛЯЦІЇ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ РІЗНИХ ЇЇ ЛАНОК  
ЗА УМОВ НОРМИ ТА ПАТОЛОГІЇ

14.00.03 - ендокринологія

**Автореферат**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук

Київ - 1994



00778476 (\$)

Дисертацією в рукописі

Робота виконана у лабораторії нейрохімії Інституту ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України

**Науковий консультант** - доктор медичних наук, професор  
Кононенко Владислав Якович**Офіційні опоненти:**

доктор біологічних наук Шмалько Юрій Петрович

доктор біологічних наук Масюк Анатолій Іванович

доктор медичних наук Рибаків Станіслав Йосипович

**Провідна установа** - кафедра патофізіології Чернівецького  
медінститутуЗахист відбудеться "14" лютого 1995 р. о 13 год.  
на засіданні спеціалізованої вченої ради з ендокринології  
Д 088.14.01 в Інституті ендокринології та обміну речовин  
ім. В.П. Комісаренка АМН України (254114, Київ, вул. Вишгородська, 69).З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту  
ендокринології та обміну речовин ім. В.П.Комісаренка АМН України.Автореферат розісланий "10" січня 1995 р.Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
доктор медичних наук

Т.П. БЕЗВЕРХА

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність та ступінь дослідженості теми До числа актуальних, але недостатньо розроблених, відноситься питання про роль нейромедіаторних сполук ЦНС у взаємодії нервової та ендокринної систем, які забезпечують гомеостаз та адаптацію організму до перемін умов як зовнішнього, так і внутрішнього середовища. Зміни функціонального стану ЦНС при трофічній дії гормонів є наслідком метаболічних, транспортних та рецепторних зрушень у різних структурах мозку (В.П.Комиссаренко, В.Я.Кононенко, 1980; G.Fink et al., 1991; M.Joels et al., 1992), в той час як порушення нейромедіаторних процесів у функціонально різних утвореннях ЦНС при екстремальних або патологічних станах призводить до змін діяльності нейроендокринної системи (J.Tuomisto et al., 1985).

Серед нейромедіаторів, які мають принципове значення для нормального функціонування нервової клітини, у тому числі і тієї, яка наділена в еволюції не лише нервово-провідниковою, але і нейросекреторною функціями, виділяється гамма-аміномасляна кислота (ГАМК) - основний медіатор синаптичного гальмування (J.Mc Queen et al., 1987). Дослідження ГАМК у різних аспектах привело до цілого ряду фундаментальних уявлень про можливе значення цієї амінокислоти у регуляції багатьох фізіологічних функцій організму, про її взаємодію з іншими нейромедіаторами, про залучення ГАМК до патохімічних процесів при виникненні або розвитку деяких захворювань ЦНС (К.С.Раевский и др., 1986; E.Peggy, 1991).

У багатоланцюговому процесі ГАМК-ергічної передачі нервового імпульсу існує декілька ланок, кожна з яких може включатися до реалізації адаптивних механізмів, які властиві нервовій системі, може бути "мішенню" для дії різних ендо-

генних чи екаогенних факторів та фармакологічних речовин або стати "точкою відліку" виникнення патологічного процесу. Такими є біосинтез ГАМК, процеси вивільнення та зворотнього захвату ГАМК, її перетворення, взаємодія молекул ГАМК з рецепторами. Кожен з цих процесів є сам по собі складним і регулюється різноманітними ендогенними чинниками, кількість та активність яких, в свою чергу, може контролюватися чисельними факторами, в т.ч. і гормонами. Проте, на цей час у більшості випадків залишається неясним вплив гормонів, зокрема гормонів кори надниркових залоз, на ті чи інші ланки ГАМК-ергічної медіації.

З іншого боку встановлена участь ГАМК у механізмах контролю секреції гіпоталамічних факторів і відповідних гормонів гіпофізу (F.Elias et al., 1982; J.Tuomisto et al., 1985; Q. Mc Cann et al., 1986), в тому числі і АКТГ. Незважаючи на це, багато питань, що відносяться до механізмів реалізації інгібіторного ГАМК-ергічного контролю функції системи гіпоталамус-гіпофіз-кора надниркових залоз (ГГНС) залишаються ще нез'ясованими.

Так, невідомо значення змін метаболізму ГАМК у структурах, які приймають участь у регуляції активності ГГНС, у механізмах контролю медіатором секреції АКТГ. До кінця неясно, чи контролює ГАМК-ергічна система тонічну секрецію тропного гормону чи цей механізм включається лише при станах, які супроводжуються його гіперсекрецією? Важливим вбачається питання про роль ГАМК у процесах зворотньої регуляції секреції АКТГ кортикостероїдами, наприклад, залишається невивченим значення ГАМК-ергічної системи аденогіпофізу у процесах регуляції його кортикотропної функції. Повністю невідомим є стан центральної ГАМК-ергічної системи мозку при захворюван-

нях, які пов'язані з порушеннями функції ГГНС, зокрема, при гіперкортицизмами. Нарешті, чекає свого вирішення питання про причини різного індивідуального терапевтичного ефекту деяких ГАМК-ергічних препаратів у хворих на хворобу Іценка-Кушинга чи синдром Нельсона, а також пошук інших ефективних ГАМК-ергічних препаратів для нормалізації функції ГГНС при цих захворюваннях.

**Мета роботи** З'ясувати стан головних нейрохімічних процесів, які забезпечують функціонування системи основного гальмівного нейромедіатора ЦНС у лімбічних структурах мозку в умовах модулювання функціональної діяльності мозку при зміні рівня гормонів ГГНС в організмі, а також визначити значення різних ланок ГАМК-ергічної системи у механізмах контролю секреції АКТГ в нормі та при зміні стану ГГНС у експериментальних тварин, а також у людини в умовах патології ГГНС.

**Основні завдання дослідження:**

1. В умовах моделювання різного рівня АКТГ та кортикостероїдів в організмі щурів вивчити у гіпоталамусі і гіпокампі вміст та обмін ГАМК по основному і поліаміновому шляхах у різних кліткових пулах медіатора, транспорт ГАМК синаптосомами і рецепцію ГАМК синаптосомальними мембранами;

2. Вивчити вплив ГАМК і деяких її агоністів та антагоністів на вміст АКТГ у плазмі крові інтактних, стресованих та адреналектомованих тварин, контролюючи при цьому вміст ГАМК у гіпоталамусі та плазмі крові, а також активність ферментів основного шляху обміну ГАМК у гіпоталамусі;

3. Визначити кінетичні параметри рецепторного зв'язування  $^{14}\text{C}$ -ГАМК плавматичними мембранами адепогіпофізу щурів за умов змін рівня АКТГ та кортикостероїдів в організмі;

4. Встановити рівень ГАМК та величину активності ферменту

її синтезу у крові здорових осіб і пацієнтів, які страждають на хворобу Іценка-Кушинга, та оцінити їх залежність від ряду фізіологічних, клінічних та гормональних показників;

5. Вивчити ефект ГАМК та її агоністів на функціональний стан ГНС у хворих з гіперкортицизмом.

6. Визначити активність ферменту синтезу ГАМК та рівень її специфічного зв'язування плазматичними мембранами надниркових залоз щурів при дії ГАМК та деяких її агоністів, а також дослідити ці показники у корі надниркових залоз хворих з гіперкортицизмом.

Наукова новизна дослідження В цій роботі вперше:

- детально вивчені особливості впливу різного рівня АКТП та кортикостероїдів на обмін ГАМК у кліткових компартментах амінокислоти, її транспорт синаптосомами та рецепцію синаптосомальними мембранами гіпоталамусу та гіпокампу щурів;

- представлені результати аналізу змін кінетичних параметрів функціонального стану ГАМК-рецепторів аденосиніази щурів за умов активації чи гальмування функції останнього при адrenaлектомії або введенні гормонів ГНС;

- з'ясована роль різних ланок (метаболических та рецепторних) і різних рецепторів ГАМК у механізмах ГАМК-ергічної медіації процесів контролю секреції АКТП у щурів в нормі, при стресі чи адrenaлектомії;

- показано, що вміст ГАМК у крові здорових осіб відносно стабільний, а активність ферменту синтезу ГАМК залежить від статі та віку, а у жінок і від фази менструального циклу;

- знайдено, що у певної частини хворих на хворобу Іценка-Кушинга рівень ГАМК у крові знижений; існує взаємозв'язок між вмістом у крові ГАМК та рівнем АКТП і кортизолу у крові, екскрецією гормонів кори надниркових залоз з сечею, а також

величиною артеріального тиску;

- визначена залежність впливу різних ГАМК-ергічних препаратів на вміст АКТГ та кортизолу від вихідного рівня ГАМК у крові та стану хворих;

- відмічено, що ГАМК та її фенільний похідний змінюють активність ферменту синтезу ГАМК та рівень специфічного зв'язування медіатора плазматичними мембранами надниркових залоз шурів;

- встановлено, що зв'язування ГАМК плазматичними мембранами кори надниркових залоз у хворих з гіперкортицизмом підвищено.

**Науково-практична значимість роботи** Теоретичні положення, які випливають з результатів проведеного дослідження, є суттєвим внеском у розширення та розвиток проблеми "Механізм дії гормонів", зокрема, такої її складової частини як "Гормони та мозок". Одержані дані розкривають важливе значення модуляції нейрохімічних механізмів системи основного гальмівного медіатора ЦНС - ГАМК - у структурах лімбіко-гіпофізарного комплексу при змінах балансу гормонів ГГНС в організмі, а також роль цих модуляцій у контролі нейроендокринної функції ГГНС.

Встановлення певних порушень функціонування системи ГАМК у хворих на хворобу Іценка-Кушинга дозволяє вважати доведеним мультимедіаторний характер первинного "дефекту" у структурах, які контролюють секрецію АКТГ, та орієнтує лікарів на необхідність визначення індивідуального типу медіаторних порушень у хворих і корегування їх відповідними препаратами, що змінюють у структурах мозку стан тих чи інших медіаторів.

Крім зазначеного, результати роботи вказують на важливість вивчення зовсім нових питань у проблемі взаємовідносин нер-

вової та ендокринної систем - про роль периферичних тканинних медіаторів у регуляції функції ендокринних залоз.

**Основні наукові положення, які виносяться на захист**

- Всі нейрохімічні процеси (синтез, метаболізм, транспорт, рецепція), які забезпечують функціонування ГАМК-ергічної системи гіпоталамусу та гіпокампі, залучаються до реалізації впливу гормонів ГГНС на мозок. В залежності від структури лімбічної системи, компартменту амінокислоти, тривалості дії гормонів та їх виду, вихідного гормонального стану організму спектр амін цих процесів під дією гормонів різниться.

- У гіпоталамусі гормони ГГНС запускають природний ГАМК-ергічний антистресорний механізм за рахунок активації синтезу та накопичення медіатору у нервових закінченнях при будь-якому (за характером чи тривалістю) підвищенні рівня кортикостероїдів, що поряд із збільшенням інтенсивності рецептування медіатору при короткочасній дії глюкокортикоїдів, та/або із збільшенням вивільнення ГАМК у синаптичну щілину під впливом АКГ охороняє нервові клітини від надмірного збудження та обмежує збудливість гіпоталамічних структур, що відносяться до власне стресорного апарату.

- У гіпокампі для ГАМК-системи при короткочасній дії гормонів більш характерна функція метаболічного механізму, який забезпечує підтримання важливих енергетичних реакцій мозку в умовах адаптації; зміни стану синаптосомальної ГАМК-ергічної системи при дії гідрокортизону впливають на процеси, що контролюють нейроендокринну функцію гіпоталамусу.

- Основними ланками, які залучаються до реалізації механізмів ГАМК-ергічного контролю кортикотропної функції аденогіпофізу у нормі та при гіперсекреції АКГ, є рецепторні

структури, що входять до олігомерного комплексу ГАМК<sub>A</sub>/бензодіазепін/Cl<sup>-</sup>-канал (ГАМК<sub>A</sub>/БД/Cl<sup>-</sup>-канал), а також ГАМК<sub>B</sub>-рецептори структур мозку, які беруть участь у регуляції функції ГНС.

- ГАМК-рецептори аденогіпофізу залучені до механізму зворотньої регуляції кортикоостероїдами секреції АКТГ; модуляція кількості та спорідненості низькоафінних ГАМК-рецепторів носить компенсаторний характер та спрямована на збереження певного рівня функціонування кортикотропів за умов різкої зміни секреції АКТГ.

- Порушення діяльності ГАМК-ергічної системи лімбічних структур мозку або аденогіпофізу при стресі може бути однією з причин зривів регуляторних механізмів ГНС та частиною нейропатогенетичної основи виникнення хвороби Іценка-Кушинга.

- Проведення діагностичних проб у хворих на хворобу Іценка-Кушинга із застосуванням ГАМК-ергічних препаратів поряд з препаратами іншої нейромедіаторної природи дозволяє з'ясувати індивідуальний тип нейротрансмітерних порушень регуляції кортикотропної функції у хворих з гіперкортицизмом і вирішити питання про доцільність включення ГАМК-ергічних препаратів у комплексну терапію хвороби Іценка-Кушинга.

- Одним з механізмів впливу ГАМК та фенібуту на кортикотропну функцію аденогіпофізу є їх безпосередня дія на рівні кори надниркових залоз; певне значення при цьому може мати ГАМК-ергічна система секреторних клітин.

**Реалізація результатів наукових досліджень** По темі дисертації опубліковано 36 наукових робіт та інформаційний лист МОЗ України.

**Апробація роботи** Основні положення дисертації доповідали-

ся та були обговорені на ІІ Всесоюзному з'їзді ендокринологів (Ленінград, 1981), ІV Українському біохімічному з'їзді (Дніпропетровськ, 1982), ІХ Всесоюзній нейрохімічній конференції (Єреван, 1983), засіданні Київського міського товариства ендокринологів (Київ, 1983), Конференції ендокринологів Прибалтійських республік (Тарту, 1984), ІІІ Всесоюзному симпозиумі "Стрес, адаптація та функціональні порушення" (Кишинів, 1984), Міжнародному симпозиумі по нейроендокринології (Ленінград, 1985), V Всесоюзному біохімічному з'їзді (Київ, 1986), засіданні Київського міського товариства ендокринологів (Київ, 1987), ІІІ Всесоюзній конференції по нейроендокринології (Харків, 1988), ІІІ Всесоюзному з'їзді ендокринологів (Ташкент, 1989), ІV Всесоюзному симпозиумі "Стрес, адаптація та дисфункції" (Кишинів, 1991), ІІ Всеросійському з'їзді ендокринологів (Челябінск, 1991), V Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992), V з'їзді ендокринологів України (Івано-Франківськ, 1994), наукових конференціях Інституту (1983, 1986, 1992).

**Об'єм та структура роботи** Дисертація надрукована на 316 сторінках і складається із вступу, огляду літератури (3 глави), глави, в якій викладено матеріал експериментальних і клінічних досліджень та застосовані методи, 5-ти глав результатів власних досліджень, обговорення одержаних результатів, висновків, практичних рекомендацій списку літератури, який налічує 648 джерел, та додатку. Текст роботи включає 85 таблиць та 1 схему.

**Ступінь особистого внеску** Дисертаційна робота виконана самостійно. Дослідження впливу ГАМК-ергічних препаратів на функціональний стан ГГНС у хворих на хворобу Іценка-Кушинга консультував д.м.н., професор І.В. Комісаренко; частину виз-

начень вмісту АКТГ у крові хворих в цих дослідженнях проведено д.м.н. Є.В.Луцицьким.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

**Об'єкт та постановка експериментальних досліджень** Досліди проведені на щурах-самцях л'її Вистар масою 150-200 г (2720 щурів). В експериментах *in vivo* використані наступні гормональні, фармакологічні та хімічні препарати (доза на 100 г маси тіла): гідрокортизон ("Gedeon Richter", Угорщина) - 5 мг; кортикотропін та суспензія кортикотропін-цинк-фосфату (Каунаський завод ендокринних препаратів) - 2,5 од; аміналон (хіміко-фармацевтичний завод "Акрихін) - 50 і 100 мг; баклофен ("Polfa", Польща) - 1 мг; бікукуллін ("Sigma", США) - 0,1 мг; вальпроат натрію (depakin, "Labas", Франція) - 40 мг; діазепам (седуксен, "Gedeon Richter", Угорщина) - 0,5 мг; нозепам (об'єднання "Уралсинтез") - 0,5 мг; пікротоксин ("Sigma", США) - 0,1 мг; фенібут (хіміко-фармацевтичне об'єднання "Олайнфарм") - 30 мг. При визначені впливу гідрокортизону у дослідах *in vitro* використовували розчинну форму гормону ("Adresson", Голландія). Гормони вводили внутрішньом'язево, аміналон - внутрішньом'язево та внутрішньочеревинно, інші препарати - внутрішньочеревинно.

Для виконання визначених у роботі задач поставлені наступні серії дослідів:

**1 і 2 серії** - одноразове введення гідрокортизону чи АКТГ інтактним щурам. Забій тварин проводили через 4 год після ін'єкції гормонів.

**3 і 4 серії** - щодобове на протязі 7 діб введення гідрокортизону чи АКТГ-цинк-фосфату інтактним щурам. Щурів декапітували через 24 год після останньої ін'єкції гормонів.

**5 серія** - адrenaлектомія. Тварин брали у дослід на 8-му добу після операції.

**6 серія** - одноразове на 8-му добу після операції введення гідрокортизону адrenaлектомованим щурам. Забій тварин проводили через 4 год після ін'єкції препарату.

**7-12 серії** - одноразове введення щурам аміналону та ГАМК-ергічних препаратів. Забій тварин проводили через 1 год після ін'єкції препаратів.

**13 серія** - моделювання стресу. Як стрес використовували примусове плавання щурів у воді (27°C) на протязі 1 год.

**14-19 серія** - одноразове введення щурам до початку плавання аміналону та ГАМК-ергічних препаратів. Забій тварин в серіях 13-21 проводили негайно після закінчення плавання.

**20-28 серії** - щоденне на протязі 7 днів введення інтактним щурам аміналону та ГАМК-ергічних препаратів.

**29-37 серії** - щоденне на протязі 7 днів введення адrenaлектомованим щурам аміналону та ГАМК-ергічних препаратів. Забій тварин в серіях 20-37 проводили через 24 год після останньої ін'єкції препаратів.

Контрольним щурам відповідно до досліді вводили фізіологічний розчин; забій тварин проводили згідно з умовами експериментів. Двобічну адrenaлектомію проводили під ефірним наркозом. Для дослідів на адrenaлектомованих щурах контролем були несправжньооперовані тварини.

Для запобігання збільшення вмісту ГАМК в мозку після смерті була використана процедура, яку запропонували J. Wood et al. (1978). Після декапітації голову тварини негайно на 5 хв занурювали у посуд з охолодженим до 0°C фізіологічним розчином. Головний мозок та гіпофіз виймали з черепної коробки, виділяли гіпоталамус, гіпокамп та, в деяких випадках,

кору великих півкуль; у частині дослідів видлучали також над-  
ниркові залози. Наважку тканин гомогенізували у скляному го-  
могенізаторі з тефлоновим товкачиком у середовищі, яке  
відповідало умовам подальших досліджень. Кров збирали після  
декапітації у центрифужні пробірки, які містили ЕДТО або ге-  
парін; при необхідності плазму зберігали у низькотемпера-  
турній шафі при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Об'єкт та постановка клінічних досліджень** Обстежений 191  
хворий на хворобу Іценка-Кушинга у віці від 18 до 60 років.  
Давність захворювання у групі обстежених хворих на хворобу  
Іценка-Кушинга склала від 6 місяців до 26 років. 23 хворих  
специфічної терапії з приводу хвороби Іценка-Кушинга не  
одержували, 146 осіб проходили лікування з приводу основного  
захворювання. До контрольної групи ввійшли 64 практично адо-  
рових донора у віці від 18 до 47 років.

При вивченні вмісту ГАМК та активності глутаматдекарбок-  
силази (ГДК) у крові хворих на хворобу Іценка-Кушинга (111  
осіб) приймали до уваги ряд клінічних та лабораторних показ-  
ників, які були одержані при обстеженні пацієнтів у клініці  
(АТ, вміст АКТГ та кортизолу у крові, екскреція з сечею  
17-ОКС, 17-КС, 11-ОКС).

При дослідженні впливу ГАМК-ергічних препаратів на стан  
ГГНС у хворих на хворобу Іценка-Кушинга (58 осіб) були вико-  
ристані наступні препарати: аміналон у дозі 1 г, фенібут -  
750 мг і вальпроєва кислота (Convulex, ФРТ) - 600 мг. Кров  
брали до і через 60 та 120 хв після прийому препаратів. У  
випадку багаторазового прийому аміналон призначали у дозі  
2-3 г щоденно на протязі місяця. У всіх випадках кров для  
аналізу брали з ліктьової вени натщесерце. В одержаній після  
центрифуговування плазмі в день забору визначали вміст ГАМК та

активність ГДК або зберігали її в низькотемпературній шафі (-20°C) до визначення рівня АКПГ та кортизолу.

При визначенні активності ГДК у гомогенаті та специфічного зв'язування  $^{14}\text{C}$ -ГАМК плазматичними мембранами кори надниркових залоз хворих на хворобу Іценка-Кушинга тканину залози отримували під час проведення адреналектомії (22 хворих). Контролем у цих дослідженнях була "відносно незмінена" тканина кори надниркових залоз, яку одержували при видаленні пухлини разом з залозою у хворих на синдром Іценка-Кушинга (8 осіб).

Методи дослідження Фракцію синаптосом та "чистих" мітохондрій виділяли методом диференційного центрифугування у градиенті щільності сахарози (В.В.Шевцов и др., 1972). Фракцію синаптичних мембран структур мозку одержували з "грубої" мітохондріальної фракції, фракцію плазматичних мембран з аденогіпофізу або з надниркових залоз - з гомогенату тканин.

Вміст ГАМК у тканині мозку, синаптосомах та плазмі крові визначали за допомогою методу іонообмінної хроматографії (S.Lingren et al., 1982); для кількісного визначення ГАМК в елюаті проводили реакцію з орто-фталевим ангідридом. Розділення біологічних форм амінокислот здійснювали за методом R.Lowell et al. (1963). Для розділення амінокислот використовували метод нисхідної паперової хроматографії (Г.Н.Зайцева и др., 1958). Методом нисхідної паперової хроматографії визначали також вміст ГАМК у гіпофізі. При цьому амінокислоту екстрагували 90% етанолом з тканини залози від 5-6 щурів. При визначенні швидкості обміну ГАМК використовували ефект 3-МПК, сильного конкурентного інгібітору ГДК, який дозволяє виміряти швидкість зчезнення ГАМК після блокади її синтезу

(C.Gomes et al., 1982). Вміст поліамінів у тканині та синаптосомах мозку визначали за допомогою іонообмінної хроматографії (Y.Endo, 1975); для кількісного визначення поліамінів в елюатах у присутності Брідж-35 та 2-меркаптоетанолу проводили реакцію з орто-фталевим ангідридом.

Активність ГДК та ГАМК-амінотрансферази визначали у гомогенаті, синаптосомах, мітохондріях, а також у плазмі крові флуориметричними методами (I.Graham et al., 1969; C.Atterwill, 1976). Активність орнітиндекарбоксілази (ОДК) у гомогенаті і синаптосомах, а активність S-аденозилметіоніндекарбоксілази (S-АМДК) у синаптосомах визначали радіологічними методами (M.Cousin et al., 1982, F.Shashan et al, 1973). Утворення  $^{14}\text{C}$ -ГАМК з  $^{14}\text{C}$ -путресцину досліджували за методом, який був описаний для тканини печінки (W.Fogel et al., 1982); кількість  $^{14}\text{C}$ -ГАМК, яка утворилася за 1 год інкубації, прораховували на рідинному сцинтиляційному лічильнику після хроматографування екстрактів синапсом на колонці з Dowex-50W.

При визначенні вивільнення  $^3\text{H}$ -ГАМК аліквоту суспензії синапсом інкубували з міченою амінокислотою, склад інкубаційного середовища наведений у роботі J.Simon (1974). Реакцію зупиняли охолодженням до  $0^\circ\text{C}$   $0,32\text{ M}$  розчином сахарози, проби центрифугували, до осаду синапсом добавляли 1 мл інкубаційної суміші та інкубували 10 хв при  $27^\circ\text{C}$ . Вивільнення  $^3\text{H}$ -ГАМК зупиняли швидкою фільтрацією суспензії через мембранні фільтри з діаметром пор  $0,23\text{--}0,4\text{ мкм}$ . Початкову швидкість захоплення  $^3\text{H}$ -ГАМК синаптосомами визначали при інкубації їх аліквоти на протязі 2 хв при  $37^\circ\text{C}$  у фосфатному буфері Кребса, який містив глюкозу, з різними концентраціями  $^3\text{H}$ -ГАМК (A.Miller et al., 1978). Після закінчення інкубації

проби розводили 5-кратним об'ємом середовища інкубації та фільтрували через мембранні фільтри. Синаптосоми на фільтрі промивали тим же розчином, фільтри висушували на повітрі та переносили у флакони з сцинтиляційною рідиною ЖС-107.  $V_{\max}$  і  $K_m$  були одержані при побудові кривих за методом Лайнуївера-Берка.

Для визначення  $Na^+$ -незалежного зв'язування  $^3H$ -ГАМК синаптичними мембранами аліквоту суспензії синаптичних мембран інкубували на протязі 10 хв при  $0^{\circ}C$  з 50 нМ трис-цитратним буфером і 5 нмоль  $^3H$ -ГАМК (T. Asano et al., 1980). Специфічне зв'язування  $^3H$ -ГАМК визначали як різницю між загальним (при відсутності) і неспецифічним (у присутності  $10^{-3}$  М стабільної ГАМК) зв'язуванням. Відокремлення зв'язаної  $^3H$ -ГАМК від вільної проводили швидкою фільтрацією проб через мембранні фільтри, їх в подальшому обробляли так само, як при вивченні зворотнього захвату  $^3H$ -ГАМК.

При визначенні зв'язування  $^{14}C$ -ГАМК плазматичними мембранами аденогіпофізу або надниркових залоз реакцію зупиняли центрифугуванням проб при 40 000 g на протязі 10 хв ( $0^{\circ}C$ ). Величину  $K_d$  і  $V_{\max}$  розраховували, використовуючи метод Корніш-Боуден (К.В.Машілов и др., 1987).

Вміст білку у гомогенатах та субклітинних фракціях визначали за методом Lowry у модифікації T. Hartree (1972). Рівень кортикотропіну у плазмі крові визначали за допомогою комерційних радіоімунних наборів фірм "Amersham" (Великобританія) та "CIS" (Франція); вміст кортизолу - радіоконкурентним методом, використовуючи набори "Корт- $^3H$ "; вміст кортикостерону - за флуориметричним методом De Mooge у мікромодифікації (И.Г.Васильева и др., 1991).

Статистична обробка даних проведена за Стьюдентом

(М. А. Ойвин, 1964). Статистично значущою вважали відмінність при  $P_t < 0,05$ . При  $0,1 > P_t > 0,05$  проводили додаткову статистичну обробку даних із застосуванням непараметричного критерію Вілкоксона-Манна-Уїтні. Статистично значущими в цьому випадку вважали відмінність при  $P_U < 0,05$ . Оцінювання статистичного зв'язу показників, що р'вчались, проводили за допомогою рангової кореляції Спірмена; при порівнянні коефіцієнтів кореляції використовували метод, який заснований на перетворенні Фішера (Е. В. Гублер и др., 1973). При статистичній обробці даних, які були одержані при застосуванні методу Корніш-Боуден, як значення величини, що вивчалась, розглядали медіану (Г. В. Лакін, 1980); порівняння парних рядів величин  $K_d$  та  $V_{max}$  проводили за методом критерію знаків.

#### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Система ГАМК гіпоталамусу і гіпокампу щурів за умов змін рівня кортикотропіну та кортикостероїдів в організмі При виконанні роботи на експериментальних моделях короточасного підвищення рівня АКТР та кортикостероїдів, ендогенного та екзогенного гіперкортицизму та в у мовах гіпокортицизму (адrenalектомія) були одержані нові дані, які характеризують гормональну регуляцію біосинтезу ГАМК, процесів вивільнення та зворотнього захвату медіатора і його рецептування у двох центральних структурах лімбічної системи мозку - гіпоталамусі та гіпокампі. Враховуючи складність внутрішньоклітинної компартменталізації обміну ГАМК, вивчали процеси синтезу та метаболізму амінокислоти як у загальному, так і в синаптосомальному та мітохондріальному пулах, контролюючи при цьому у крові рівень гормонів ГГНС.

Через 4 год після одноразового введення гідрокортизону на

тлі передбачаємого підвищення у гіпоталамусі рівня (S.Feldman, 1983; B.Yongue et al., 1987) та рецептування (А.Я.Местечкина и др., 1980; R.Spenser et al., 1990) гідрокортизону та кортикостерону спостерігалося значне посилення синтезу, підвищення вмісту вільної та зв'язаної ГАМК, часу її оборту у загальному пулі амінокислоти в цій структурі мозку. Аналогічні зміни виявлені і при дослідженні метаболізму ГАМК у синаптосомах гіпоталамусу: вміст медіатору підвищувався за рахунок синтезу його як з глутамату, так і з орнітину через путресцин. Підвищення вмісту останнього було пов'язано із зниженням його перетворення у спермідин. За цих умов транспорт ГАМК синаптичними мембранами залишався незмінним, а рецепція її ставала інтенсивнішою.

Одержані дані свідчать про активацію більшості нейрохімічних ланок власне ГАМК-ергічної системи гіпоталамусу, а також шляху синтезу ГАМК з орнітину через путресцин при короткочасному підвищенні рівня кортикостероїдів в організмі, тобто, при моделюванні гормонального компонента нетривалого стресу, адаптація до якого, як було показано раніше, супроводжується підвищенням у мозку активності ГДК або накопиченням ГАМК (Z.Gottesfeld et al., 1978; Ф.З.Меерсон и др., 1987) без посилення вивільнення заново синтезованої ГАМК у гіпоталамусі (Y.Yoneda et al., 1984).

Одноразове введення АКП багато в чому викликало подібні зміни обміну медіатору, особливо це стосувалося синаптичного компартменту амінокислоти: посилювався синтез ГАМК з глутамату та путресцину, підвищувався її вміст; оборот ГАМК гальмувався, збільшувалася інтенсивність рецепції. Крім того, відмічена активація вивільнення медіатору з синапсом. Причина деякої різниці впливу гідрокортизону та АКП полягає,

на нашу думку, у відмінностях накопичення кортизолу та кортикостерону у гіпоталамусі за цих умов. Різний за ступенем біологічний ефект цих двох гормонів відомий (В.Г.Шалапина, 1986) і пов'язаний з неоднаковою їх властивістю активувати кортикостероїдні рецептори I та II типу (R.Spencer et al., 1990). Неможливо також не враховувати і імовірний самостійний вплив АКГГ на процеси транспорту медіатора.

Підвищення рівня синаптосомальної ГАМК, а також рецептування її постсинаптичними мембранами гіпоталамусу в умовах гормональної моделі гострого стресу може відігравати специфічну роль гальмівного чинника у регуляції секреції КРФ (J.Tuomisto et al., 1985; E.Hillhouse et al., 1989), рівень виділення якого з гіпоталамусу знижується через 3 год після ін'єкції гідрокортизону (Л.И.Ставицкая, 1980). Таким чином, на наш погляд, природний ГАМК-ергічний антистресорний механізм спрацьовує в умовах короткочасного впливу, який не повторюється (короткочасне підвищення рівня кортикостероїдів), в основному, за рахунок підвищення синтезу, вмісту та рецептування гальмівного медіатора у гіпоталамусі, що поступово знижує інтенсивність розповсюдження імпульсу та обмежує збудливість нейронів гіпоталамічних структур. У післястресорному періоді інтенсифікація ГАМК-ергічної системи відбувається, зважаючи на дані Ф.З.Меерсона (1984), у напрямку підвищення використання ГАМК та утворення з неї ефективного гальмівного метаболіту - гамма-оксимасляної кислоти.

При багаторазовому введенні гідрокортизону вміст ГАМК у загальному та синаптосомальному пулах амінокислоти, її синтез з глутамату та путресцину, швидкість оборту ГАМК, а також утворення путресцину у гіпоталамусі щурів так само, як і при одноразовому введенні гормону, підвищувалися. Різниця у

дії гормону, яка залежить від кратності його введення, становилася лише рецептування медіатору синаптичними мембранами: при 7-денному введенні зв'язування  $^3\text{H}$ -ГАМК не змінювалося. У цілому можна заключити, що за умов тривалого надлишку в організмі екзогенних кортикостероїдів при підвищенні у гіпоталамусі вмісту як гідрокортизону, так і кортикостерону, але відсутності змін рецептування першого та зниження рецепції другого (А.Я.Местечкина и др., 1980; В.Г.Шалапина, 1986) система ГАМК у цій структурі мозку знаходиться в активованому стані, проте глибина метаболічної активації при цьому дещо менша, ніж за умов одноразового введення, що може свідчити про початок зниження здатності метаболічних ланок ГАМК-системи реагувати на підвищення рівня гормонів. Крім цього, подальші процеси реалізації гальмівного ефекту медіатору - вивільнення у синаптичну щілину та рецептування - за цих умов залишаються без змін.

При багаторазовому введенні АКГ у гіпоталамусі знайдено підвищення у синаптосомах синтезу медіатору (з глутамату та, особливо значно, з путресцину), збільшення вмісту та вивільнення ГАМК з синапсом, що аналогічно одноразовому введенню гормону. В той же час, у порівнянні з останнім, у загальному пулі відмічені відсутність зрушень вмісту та зниження часу обертів ГАМК, а у синаптосомальному - протилежні за напрямком зміни вмісту путресцину та активності S-АМДК, а також інтенсивності рецептування медіатору. Отже, в умовах тривалого надлишку в організмі екзогенного АКГ та ендогенних кортикостероїдів, зокрема, підвищення вмісту та інтенсивності рецептування кортикостерону у гіпоталамусі (А. Magarines et al., 1989), має місце накопичення ГАМК у нервових закінченнях структури поряд з підвищенням її вивільнення у синаптич-

ну щілину. Зниження рецепторного зв'язування  $^3\text{H}$ -ГАМК при цьому може відображати стан зайнятості рецепторів ендogenous амінокислотою або зниженням їх кількості за умов тривалого надлишку медіатора у щілині. Раніше було показано, що тривалий стрес зменшує щільність рецепторів ГАМК, що розглядається як адаптивна відпор'ядь рецепторних структур на тривалий надлишок ГАМК у синаптичній щілині (G. Biggio et al., 1981; В.О. Никурадає и др., 1988).

При адrenaлектомії за умов зниження вмісту глюкокортикоїдів у мозку рівень ГАМК у гіпоталамусі суттєво не змінювався, спостерігали лише зниження вмісту зв'язаної форми амінокислоти, хоча вміст синаптосомальної ГАМК залишався на рівні контролю. У синаптосомах зменшувалась інтенсивність трансамінування амінокислоти; синтез путресцину за цих умов був підвищений, а вміст його знижений, при тому що подальший обмін путресцину як до ГАМК, так і до вищих поліамінів, не змінювався. На фоні таких незначних зрушень в обміні ГАМК, а також відсутності змін у її рецепції транспорт медіатора був підвищений. Реакція ГАМК-ергічної системи гіпоталамусу на одноразове введення гідрокортизону у адrenaлектомованих щурів різнилася від такої у інтактних: у адrenaлектомованих не спостерігали активації синтезу ГАМК, навпаки, її утворення з путресцину було навіть нижче, ніж у нормальних тварин. Одноразове введення гідрокортизону нормалізувало вміст зв'язаної форми ГАМК та активність ОДК, при цьому відмічено підвищення інтенсивності рецепції медіатора, що аналогічно одноразовому введенню гідрокортизону інтактним щурам.

Отже, одержані дані про вплив короточасного та тривалого надлишку екзогенних або ендogenous кортикостероїдів, а також нестачі гормонів кори надниркових залоз на стан ГАМК-ергіч-

ної системи у гіпоталамусі свідчать, що будь яке (за характером чи тривалістю) підвищення рівня глюкокортикоїдів в організмі шурів викликає активацію ГДК та накопичення ГАМК у нервових закінченнях гіпоталамусу, що є одним з маркерів змін збудливості нейрону (S.Hori, 1982). Певний вклад у збільшення рівня ГАМК у синапсах гіпоталамусу вносить і підвищення синтезу ГАМК по поліаміновому шляху. Відсутність активації синтезу ГАМК у гіпоталамусі адреналектомованих тварин після ін'єкції гідрокортизону пов'язана з тим, що при введенні їм гормону, хоча і відбувається нормалізація його вмісту та часткове відновлення рівня кортикостерону у крові, але не спостерігається надлишку гормонів кори надниркових залоз.

Вплив гормонів на подальші шляхи реалізації фізіологічної дії ГАМК у синапсах гіпоталамусу може бути різним: інтенсивність процесів транспорту ГАМК не змінювалася при короткочасному або тривалому підвищенні рівня екзогенного гідрокортизону, але за умов дії АКТГ процеси вивільнення медіатора значно активувалися. Підтвердженням припущення про можливий прямий вплив АКТГ на процеси транспорту ГАМК у синапсах можуть бути дані про інтенсифікацію їх в умовах адреналектомії, коли вміст АКТГ в організмі тварин значно збільшений. Щодо участі процесів рецептування ГАМК у зміні функціонального стану системи медіатору, то важливим для їх активації вважаємо підвищення як вмісту, так і інтенсивності взаємодії гормонів із своїми рецепторами: в тих випадках, коли спостерігається підвищення вмісту та рецепції гормонів у гіпоталамусі (одноразове введення гормонів, багаторазове введення АКТГ) відмічені і зміни рецептування ГАМК. В умовах, коли підвищення рівня гормонів сполучається із зниженням їх ре-

цептування (багаторазове введення гідрокортизону), або навпаки (адреналектомія), видимої реакції ГАМК-рецепторів гіпоталамусу на зміну балансу кортикостероїдів в організмі не було. Ці факти є цікавими з урахуванням даних, згідно яких рецептори глюкокортикоїдів на синаптичній мембрані локалізовані у складі олігомерного комплексу ГАМК<sub>A</sub>/BD/Cl<sup>-</sup>-канал (P. Supaviali et al., 1986).

Що інший характер мав вплив різного рівня кортикостероїдів та АКТГ на ГАМК-ергічну систему у гіпокампі щурів. При одноразовому введенні гідрокортизону обмін ГАМК у синаптичному нейромедіаторному компартменті амінокислоти практично не змінювався. Відмічено лише підвищення її синтезу з путресцину та зниження інтенсивності трансамінування при введенні гідрокортизону; останнє може свідчити про гальмування утворення гамма-оксимасляної кислоти. Транспорт ГАМК та її рецептування синаптичними мембранами гіпокампу залишалися на рівні контролю. Навпаки, введення АКТГ (також на фоні незмінного рівня та обміну медіатору) приводило до зменшення вивільнення та підвищення інтенсивності рецептування <sup>3</sup>H-ГАМК; останнє може бути пов'язане не тільки з прямою дією глюкокортикоїдів на рецепторні структури, а зі зменшенням під впливом гормонів вивільнення ГАМК у синаптичну щілину. Менш значна метаболічна реакція ГАМК-системи синапсом гіпокампу на підвищення рівня кортикостероїдів в організмі, в порівнянні з гіпоталамусом, може свідчити, певно, про те, що в умовах короткочасного стресу метаболізм ГАМК у нервових закінченнях гіпокампу відіграє не дуже важливу роль у змінах функціонального стану цієї структури.

В той же час зміни обміну ГАМК у загальному пулі амінокислоти гіпокампу при відсутності таких у синапсосомах в

умовах одноразового введення гормонів свідчать про роль ГАМК у механізмах дії кортикостероїдів на процеси загального метаболізму мозку. На це вказують також дані про аміни в цих умовах у гіпокампі рівня лише вільної форми амінокислоти, для якої є більш характерним участь у азотистому обміні мозку, а також особливості у профілі амін обміну ГАМК у мітохондріальному пулі. Аналіз даних літератури про метаболізм ГАМК у мозку при екстремальних станах організму свідчить, що система гальмівного медіатора може виступати не тільки в ролі стрес-лімітуючого нейромедіаторного чинника, але і компенсаторного метаболічного механізму, який забезпечує підтримання важливих енергетичних реакцій мозку (В.А.Розанов, 1989).

В цьому плані цікаво відмітити чіткий протилежний ефект одноразового введення гідрокортизону та АКТГ. У першому випадку у гіпокампі спостерігали активацію синтезу з глутамату та збільшення вмісту ГАМК, час оборту амінокислоти зростає, підвищувався синтез та вміст путресцину, як одного з її попередників, а також сперміну та спермідину, як попередників путресцину; метаболізм амінокислоти по шляху її трансамінування в цих умовах був пригнічений. Враховуючи, що активація не тільки основного, але і поліамінового шляху синтезу ГАМК спостерігається при багатьох стресорних впливах (G.Dienel et al., 1984; А.И.Менжерицкий, 1991), а також що підвищення загального вмісту та часу оборту медіатора мало місце не тільки у гіпокампі та гіпоталамусі, а і в тканині кори великих півкуль, можна вважати, що виявлені нами зміни обміну у загальному пулі ГАМК при введенні гідрокортизону є типовими для розвитку адекватної хімічної реакції мозку на гострий стресорний вплив, який, як відомо, завжди супроводжується

підвищенню рівня кортикостероїдів в організмі.

При одноразовому введенні АКГГ у гіпокампі знайдено зниження загального синтезу з глутамату та вмісту ГАМК, часу її оборту. У корі великих півкуль також спостерігали зменшення вмісту та часу оборту амінокислоти. Відмінність дії АКГГ від впливу гідрокортизону на стан метаболізму ГАМК у загальному пулі амінокислоти у гіпокампі може бути пов'язана не тільки з кількісною різницею рівня та спектру кортикостероїдів у мозку при введенні гормонів, але і з прямим впливом АКГГ (Л.А.Северьянова, 1981; Р.Н.Глебов и др., 1990). Встановлено, що дія АКГГ на деякі реакції поведінки у тварин, зокрема, вияву агресивності (М.П.Мошкин и др., 1991), у механізмах регуляції якої суттєву роль відіграє функціональний стан ГАМК-ергічної системи лімбічних утворень (M.Shaikh et al., 1990), опосередкована комбінованим впливом на мозок глюкокортикоїдів та позанаднирковою дією молекули АКГГ (H.Brain et al., 1977). Приймаючи це до уваги, можна вважати, що одержані дані щодо гальмування метаболізму по шляху ГАМК-шунту у гіпокампі при одноразовому введенні АКГГ свідчать про деяке зростання збудливості цієї структури в умовах підвищення у мозку рівня АКГГ та глюкокортикоїдів. Необхідно також звернути увагу на факт підвищення швидкості зчезнення ГАМК при введенні АКГГ, тоді як активність основних ферментів її обміну залишалася у межах норми, що можливо, пов'язане з інтенсифікацією синтезу ряду ГАМК-дериватів, частина з яких має властивості збудників нервової системи (В.А.Рованов, 1982). Таким чином, нейрохімічні дані підтверджують результати електрофізіологічних досліджень про те, що АКГГ збільшує збудливість гіпокампу (D.Pfaff et al., 1971; Н.С.Сапронов, 1975). Все це, зважаючи на сучасні уявлення

про механізми регуляції секреції АКТГ на рівні гіпокампу (J. Herman et al., 1989; R. Sapolsky et al., 1991), вказує ще на один можливий метаболічний механізм участі ГАМК-системи гіпокампу в адаптації мозку до короткочасного стресорного чинника.

Як і за умов одноразового введення гормонів, характер зрушень системи ГАМК у гіпокампі при багаторазовому їх введенні відрізнявся від такого у гіпоталамусі. 7-денне введення гідрокортизону приводило у гіпокампі до підвищення рівня лише вільної форми ГАМК у загальному, а також вмісту медіатору у синаптосомальному пулах амінокислоти за рахунок гальмування подальшого його метаболізму. При цьому у загальному компартменті спостерігали збільшення синтезу ГАМК з глутамату, а у синаптосомальному - з путресцину, рівень якого, а також синтез його та перетворення у спермідин були знижені. Транспорт ГАМК синаптосомальними мембранами за цих умов інтенсифікувався в обох напрямках і сполучався з  $V_{\max}$  зниженням спорідненості переносника до медіатору, що може вказувати на насичення переносника лігандом при рівному збільшенні рівня останнього. В той же час за умов, коли рецепторне зв'язування ГАМК залишається без змін, надлишок медіатору у синаптичній щилині може виконувати і роль ауторегулятора процесів транспорту, зміни яких направлені на посилення утилізації ГАМК. На це вказують дані про збільшення  $V_{\max}$  для зворотнього захвату ГАМК, що характеризує підвищення кількості функціонуючих місць транспорту медіатору. Результатом такої складної реакції транспортної системи ГАМК на багаторазове введення гідрокортизону є все ж збільшення ефективності транспорту медіатору. Показано, що в умовах стресу звільнення ГАМК з нейронів деяких структур мозку може регулю-

ватися пресинаптичними ауторецепторами, які відіграють важливу роль у прояві різних фізіологічних симптомів, що супроводжують стан стресу (K.Kuriyama et al., 1984).

Відмінність у впливі багаторазового введення АКГГ на стан синаптосомальної системи ГАМК гіпокампу в порівнянні з таким при введенні гідрокортизону стосувалася лише змін кількості та подальшого метаболізму путресцину, а також підвищення рецептування медіатору; зміни вмісту ГАМК у синапсосомах, інтенсивності її трансамінування, синтезу з путресцину та транспорту були аналогічними таким при багаторазовому введенні гідрокортизону. Отже, тривалий надлишок в організмі як екзогенних, так і ендогенних кортикостероїдів супроводжується збільшенням вмісту у гіпокампі синаптосомальної ГАМК, а також інтенсифікацією транспорту медіатору.

У гіпокампі адреналектомованих тварин, як і у гіпоталамусі, спектр змін параметрів системи ГАМК, що вивчалися, також виявився менш широким, ніж при введенні гормонів. За умов гіпокортицизму у гіпокампі зменшувався загальний вміст, вміст вільної та синаптосомальної ГАМК, при цьому у загальному пулі синтез ГАМК та путресцину, а також рівень останнього були знижені. Так як і в гіпоталамусі, перетворення путресцину у ГАМК у нервових закінченнях, її рецепція синаптичними мембранами не змінювалися, а транспорт медіатору інтенсифікувався в обох напрямках.

Аналіз отриманих даних дає підстави зробити висновок, що одним з важливих моментів у механізмах кортикостероїдної регуляції активності ГАМК-ергічних синапсів гіпокампу, так само як і у гіпоталамусі, є стан гормональних рецепторів: взаємодія гормонів із своїми рецепторами в умовах підвищення кількості перших призводить до запуску нейрохімічних реак-

цій, які забезпечують, у тій чи іншій мірі, активацію ГАМК-ергічних нейронів. В той же час при адреналектомії на фоні незаангажованості більшості глюкокортикоїдних рецепторів змін обміну та рецепції ГАМК у нервових закінченнях гіпокампу не відбувається. Введення гідрокортизону поряд з частковою нормалізацією вмісту та рецепції глюкокортикоїдів у мозку, частково нормалізувало вміст ГАМК у загальному пулі за рахунок зростання її синтезу з глутамату; транспорт медіатора залишався при цьому на підвищеному рівні.

Отже, при зміні в організмі рівня АКТГ та кортикостероїдів змінюється активність ГАМК-ергічної системи і у гіпокампі. При стресі у мозку спостерігається виникнення регіонарного дисбалансу в активності ГАМК-ергічних процесів (В.В. Андреев и др., 1982; J. Haagstrom et al., 1984; R. Klivet et al., 1988). Результати наших досліджень демонструють участь гормонального фактору у розвитку такого дисбалансу. У нервових закінченнях нейронів гіпокампу, в протилежність гіпоталамусу, короткочасне підвищення рівня гормонів не викликало змін вмісту медіатора, а при тривалому - метаболічний механізм накопичення медіатора був інший, ніж у гіпоталамусі. У гіпокампі більш виражена, ніж у гіпоталамусі, регуляція гормонами процесів трансмембранного переносу ГАМК, суттєвіше значення мають зміни метаболізму ГАМК по іншим шляхам та в різних пулах. При цьому більш значні метаболічні зрушення спостерігалися при введенні гідрокортизону, ніж АКТГ. Електрофізіологічними дослідженнями було встановлено, що при введенні гідрокортизону гіпокамп стає "ведучою" структурою по відношенню до інших структур великого лімбічного кола та ретикулярної формації, а зміни його збудливості суттєво відбуваються на процесах, які контролюють нейроендокринну функ-

цію гіпоталамусу (Н.М.Мальшенко, 1983). Все це сприяє переходу нейроендокринної системи управління функціями організму у новий стан, який проявляється у формуванні певних реакцій, які спрямовані на підтримку гомеостазу.

Рівниця впливу екзогенних та ендогенних глюкокортикоїдів на стан ГАМК-ергічної системи гіпоталамусу та гіпокампу пов'язана з морфо-функціональними особливостями цих структур мозку, наслідком чого є рівниця, зокрема, у динаміці надходження, накопичення та рецепції кортикостероїдів.

Результати досліджень впливу гідрокортизону та АКТГ на стан ГАМК-ергічної системи лімбічних структур мозку є одними з нечисленних, на цей час, доказів для підтвердження гіпотези про те, що регулюючий зворотній зв'язок у ГГНС існує не тільки на рівні змін концентрації гормонів у крові та відповідних структурах, але й на рівні тих ефектів, які ці гормони виявляють (А.А.Филаретов, 1992).

### Участь ГАМК у механізмах секреції АКТГ у щурів

#### 1. Вплив ГАМК-ергічних препаратів на вміст АКТГ та ГАМК у плазмі крові і обмін ГАМК у гіпоталамусі інтактних, стресованих та адреналектомованих щурів

Відомо, що власне ГАМК<sub>A</sub>-рецептори входять як складова частина до олігомерного комплексу, який складається з декількох інтегральних ланок - рецепторів, модуляторів та іонофора, кожна з них має свій вплив на кінцевий результат активації ГАМК<sub>A</sub>-рецептору (E.Costa, 1988; E.Bacon et al., 1990). За допомогою деяких агоністів та антагоністів ГАМК-рецепторів ми дослідили, які з ланок комплексу ГАМК<sub>A</sub>/бензодіазепін/Cl<sup>-</sup>-канал (ГАМК<sub>A</sub>/BD/Cl<sup>-</sup>-канал) має значення у механізмах регуляції секреції АКТГ в нормі та за умов фізіологічної (стрес) та патологічної (адреналектомія) гіперфункції кори надниркових залоз. В той же

час звертали увагу на можливе значення в цих процесах змін метаболізму ГАМК у гіпоталамусі.

Підвищення рівня синаптосомальної ГАМК у гіпоталамусі при введенні вальпроату натрію, відоме нам з даних інших авторів (W.Loscher et al., 1985), приводить до гальмування функціональної активності ГГНС у інтактних та адреналектомованих щурів. Ці результати свідчать про важливе значення факту накопичення ГАМК у нервових закінченнях у контролі кортикотропної функції гіпофізу і підтверджують висновок, що підвищення рівня ГАМК у синаптосомах гіпоталамусу при одноразовому чи багаторазовому введенні гідрокортизону або АКТГ може бути одним з нейроендокринних механізмів гальмування системи гіпоталамус-гіпофіз. У стресованих тварин ефект інгібітору подальшого метаболізму ГАМК відсутній, певно, внаслідок того, що підвищення рівня ГАМК під впливом вальпроату натрію починається через 20-45 хв. після введення (S.Lasley et al., 1984; L.Miller et al., 1988), а активація рецепторних ланок ГАМК-ергічної системи при стресі спостерігається вже через декілька секунд-хвилин (R.Schwartz et al., 1987; R.Trullas et al., 1987) і, отже, додаткове підвищення рівня синаптосомальної ГАМК при введенні вальпроату натрію може, напевно, або мати ефект у більш пізніший термін, ніж застосований в цьому дослідженні, або зовсім не мати його на фоні підвищеної активності ГАМК-ергічної системи.

Деяке незначне і короткочасне накопичення ГАМК у гіпоталамусі при одноразовому введенні інтактним тваринам екзогенної ГАМК, коли обмін ендогенної залишається без змін, навпаки, активує ГГНС; у стресованих щурів на фоні активації ендогенної ГАМК-ергічної системи екзогенна амінокислота не має впливу, так як і при багаторазовому введенні ГАМК ін-

тактним шурам, коли вміст ендогенної амінокислоти був зниженим. Припущення про ведуче значення ГАМК<sub>B</sub>-рецепторів в дії екзогенної ГАМК при одноразовому її введенні підтверджується результатами досліджень (значне підвищення рівня АКТГ) по введенню агоніста ГАМК<sub>B</sub>-рецепторів - баклофену, а також результатами, які отримані при блокаді власне ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів їх антагоністом - бікукулліном чи барбітурат-пікротоксинової суб'єдиниці рецепторного комплексу ГАМК<sub>A</sub>/ВД/Cl<sup>-</sup>- канал - пікротоксином.

В умовах стресу при короткочасному впливі ГАМК-ергічних препаратів зміни обміну та вмісту ГАМК відіграють незначну роль у процесах регуляції функції ГГНС. За цих умов більш важливим виявився вплив препаратів, які змінюють стан рецепторного комплексу ГАМК<sub>A</sub>/ВД/Cl<sup>-</sup>-канал в цілому - діазепаму та пікротоксину. Вплив діазепаму пов'язаний з пролонгуванням життєздатності активованого ГАМК<sub>A</sub>-рецепторного іонофору (A.Guidotti et al., 1983), що ще більше посилює ГАМК-ергічну медіацію і призводить до зниження функціональної активності ГГНС. Блокада барбітурат-пікротоксинової суб'єдиниці знижує функцію хлорного каналу, підвищену за умов короткочасного стресу (H.Nanoundjian et al., 1986) та перешкоджає активації усього ГАМК<sub>A</sub>-супрамолекулярного комплексу. Вважають, що рецепторний комплекс ГАМК<sub>A</sub>/ВД/Cl<sup>-</sup>- канал відіграє ключову роль у фізіологічній відповіді на стресорні стимули, бо на початку стресу зміни у ньому передують змінам рівня β-ендорфіну, α-меланотропіну та АКТГ (R.Trullas et al., 1987). На значення пікротоксинової суб'єдиниці комплексу ГАМК<sub>A</sub>/ВД/Cl<sup>-</sup>-канал у розвитку стресорної відповіді мозку вказують також дані про збільшення пр" стресі захвату <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> синаптосомами деяких структур мозку, зокрема гіпокампу, яке знімається адреналек-

томією (R.Schwartz et al., 1987) та підвищенням при стресі кількості та афінності місць зв'язування одного з агоністів барбітурат-пікротоксину суб'єдиниці (T.Mc Intyre et al., 1988).

Багаторазове введення ГАМК-ергічних препаратів інтактним та адреналектомованим щурам приводить у більшості випадків до пригнічення обміну ГАМК, що ми розглядаємо як компенсаторну відповідь на хронічну активацію тих чи інших ланок ГАМК-ергічної системи. Реакція системи ГНС на введення БД і вальпроату натрію у інтактних та адреналектомованих була подібною - пригнічення секреції АКТГ. Відомо, що у високій концентрації дія вальпроату натрію на ГАМК<sub>A</sub>-рецептор подібна дії БД та барбітуратів (N.Harrison et al., 1982). Отже, результати цих досліджень дають підстави вважати, що при багаторазовому введенні ГАМК-ергічних препаратів вплив на секрецію АКТГ мають ті з них, які впливають на стан комплексу ГАМК<sub>A</sub>/БД/Cl<sup>-</sup>-канал у цілому.

З цих позицій цікавим є протилежний ефект пікротоксину на рівень АКТГ у інтактних та адреналектомованих щурів. Так як дія пікротоксину полягає у його зв'язуванні з внутрішньою ділянкою Cl<sup>-</sup>-каналу, пригніченні Cl<sup>-</sup>-потоків, який індукується ГАМК, та зменшенні часу відкриття каналу (M.Inoue et al., 1988), то механізм його впливу (активація) на функціональний стан ГНС у інтактних тварин зрозумілий. Протилежна дія (зниження вмісту АКТГ) у адреналектомованих тварин при введенні пікротоксину вказує, можливо, на зміну конформаційного стану ГАМК<sub>A</sub>-рецепторного комплексу в умовах нестачі гормонів кори надниркових залоз. Як зазначалося вище, рецептори глюкокортикоїдів на синаптичній мембрані локалізовані саме у складі олігомерного комплексу ГАМК<sub>A</sub>/БД/Cl<sup>-</sup>-канал (P.Supavia-

li et al., 1986), а про можливість модуляції чутливості пікротоксинової суб'єдиниці до свого ліганду свідчать дані про зміни порогу судомної дії пікротоксину у щурів в умовах стресу (P.Soubrie et al., 1980).

Крім участі ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів у регуляцію секреції АКТГ за умов її посилення після адrenaлектомії, можливе залучення у цей процес і ГАМК<sub>B</sub>-рецепторів. Поряд з одержаними фактами про можливість реалізації дії екзогенної ГАМК на секрецію АКТГ через ГАМК<sub>B</sub>-рецептори, треба відмітити вплив на неї у адrenaлектомованих щурів іншого агоністу ГАМК<sub>B</sub>-рецепторів - фенібуту. Враховуючи дані про існування різних підтипів ГАМК<sub>B</sub>-рецепторів, які відрізняються чутливістю до баклофену та фенібуту, а також даних про те, що однією з важливих функцій ГАМК<sub>B</sub>-рецепторів є модуляція вивільнення медіаторів іншої природи (К.С.Раевский и др., 1986), можна заключити, що гальмування кортикотропної функції у адrenaлектомованих щурів після багаторазового введення ГАМК також частково може бути опосередковане ГАМК<sub>B</sub>-рецепторами. В той же час встановлено, що багаторазове введення екзогенної ГАМК адrenaлектомованим тваринам нормалізує змінений після видалення надниркових залоз обмін ендогенної. Цей вплив ГАМК, а також її дія на вміст ГАМК, глутамінової кислоти, а також аланіну у гіпокампі щурів багато в чому подібні до впливу інгібітору секреції АКТГ ципрогептадіну (Т.М.Мишунина, 1982; В.Я.Кононенко и др., 1983; Т.М.Мишунина и др., 1985), у механізмі дії якого, крім серотонінергічного, постулюється і ГАМК-ергічний компонент (В.Я.Кононенко и др., 1983). Отже, метаболізм ГАМК у гіпоталамусі при адrenaлектомії може бути одним з контролюючих чинників у механізмах її впливу на активність системи гіпоталамус-гіпофіз. В цьому плані треба зазначити, що

гідрокортизон, введений адrenaлектомованим щурам, поряд з гальмуванням адренкортикотропної функції аденогіпофізу у таких тварин, також нормалізує змінений рівень зв'язаної ГАМК та час оборту медіатору у гіпоталамусі.

При підсумовуванні цих даних видно, що основними ланками, які залучаються до реалізації механізмів ГАМК-ергічного контролю кортикотропної функції гіпофізу, є, певно, рецепторні структури, що входять до олігомерного комплексу ГАМК<sub>A</sub>/BD/Cl<sup>-</sup>-канал, зокрема, власне ГАМК<sub>A</sub>-рецептор, BD-рецептор та барбітурат-пікротоксинова суб'єдиниця, а також ГАМК<sub>B</sub>-рецептори структур мозку, які приймають участь у регуляції функції ГГНС. Порушення метаболізму медіатору, який є лігандом всіх типів ГАМК-рецепторів, також, до деякої міри, мають значення у процесах реалізації механізму контролю ГАМК функціонального стану ГГНС. В залежності від початкового стану або причини підвищення (фізіологічне або патологічне) функціональної активності системи гіпоталамус-гіпофіз може включатися та чи інша ланка ГАМК-ергічного регулюючого механізму. Той факт, що дія деяких ГАМК-ергічних препаратів відбувається *in vivo* у інтактних тварин, тобто при нормальному рівні функціонування ГГНС, свідчить, що ГАМК приймає участь у регуляції не тільки стимульованої, але і тонічної секреції АКТГ.

**2. Кінетичні параметри рецепторного зв'язування <sup>14</sup>C-ГАМК мембранами аденогіпофізу щурів за умов моделювання ріаного рівня АКТГ та кортикостероїдів в організмі** З огляду на важливу роль змін стану ГАМК-ергічної системи у гіпоталамусі у процесах регуляції секреції КРФ, цікавим та важливим вбачається також значення модуляції вмісту та рецепції ГАМК в аденогіпофізі у механізмах реалізації впливу кортикостероїдів на кортикотропну функцію за принципом зворотнього зв'язу-

ну. Результати, які були одержані при вивченні рецепторного зв'язування ГАМК п-зматичними мембранами аденогіпофізу, свідчать про те, що ГАМК-рецептори залози приймають участь у механізмах регуляції кортикостероїдами секреції АКТГ: короткочасна дія глюкокортикоїдів зачіпає в основному стан високоафінних рецепторів, характер змін якого передбачає початок активації ГАМК-ергічних механізмів гальмування секреції АКТГ. При довготривалому надлишку кортикостероїдів в організмі поряд з підвищенням спорідненості високоафінних рецепторів значні зміни спостерігаються у стані низькоафінних ГАМК-рецепторів. Зв'язування медіатору цим типом рецепторів практично відсутнє; можливо, така реакція є компенсаторною як наслідок глибокого гальмування функції ГГНС і направлена на збереження певного рівня функціонування кортикотропів в цих умовах.

У гіпофізі, як і у мозку (N.Akaike et al., 1986; N.Lamberts et al., 1990), існує, як мінімум, дві незалежні системи регуляції ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів: одна з них орієнтується на низькоафінні і реалізується на рівні складових комплексу ГАМК<sub>A</sub>/ВД/Cl<sup>-</sup>-канал, який, в свою чергу, алостерічно взаємодіє з глюкокортикоїдними рецепторами (M.Majewska et al., 1985; P.Supaviali et al., 1986). Робота другої системи, яка контролює високоафінні ГАМК<sub>A</sub>-рецептори, опосередкована ГАМК-модуліном та цАМФ-залежною протеїнкіназою (А.Я.Корнеєв и др., 1985; N.Lamberts et al., 1990). Вибірковість змін активності цих регулюючих систем в умовах короткочасного або тривалого надлишку глюкокортикоїдів в організмі забезпечує тонку ГАМК-ергічну регуляцію процесів секреції АКТГ на рівні аденогіпофізу.

При адреналектомії на тлі низького рівня глюкокортикоїдів

в організмі та високого вмісту АКТГ обидва типи ГАМК-рецепторів реагують змінами свого функціонального стану, причому напрямок зрушень для низько- та високоафінних рецепторів був протилежний, що підтверджує думку про різну участь цих типів ГАМК-рецепторів у механізмах регуляції секреції АКТГ на рівні аденогіпофізу. Порушення функціонального стану ГАМК-рецепторів в аденогіпофізі у адреналектомованих щурів відбувається при зниженні рівня ГАМК у аслові. З огляду на це, підвищення кількості низькоафінних рецепторів вкладається в уявлення про регуляцію щільності рецепторів концентрацією ліганду і також вказує на можливу компенсаторну реакцію з боку низькоафінних ГАМК<sub>α</sub>-рецепторів аденогіпофізу. Введення гідрокортизону адреналектомованим щурам підвищувало вміст ГАМК в аденогіпофізі, при цьому також нормалізувалося і рецептування ГАМК обома типами рецепторів та знижувався рівень АКТГ у крові.

Цікаво відмітити, що, на відміну від рецепції ГАМК у гіпоталамусі, де стан ГАМК-рецепторів залежить в більшій мірі від рівня АКТГ, ніж кортикостероїдів, підвищення рівня АКТГ у організмі після введення екаогенного гормону не впливало на кінетичні параметри специфічного зв'язування <sup>14</sup>C-ГАМК мембранами аденогіпофізу. Проте зміни рівня ендогенного гормону при введенні гідрокортизону чи адреналектомії були пов'язані із змінами стану рецепторів ГАМК.

На жаль, наші дослідження не дають відповіді на питання про локалізацію ГАМК-ергічних механізмів, які конкретно залучаються до контролю секреції АКТГ при тих чи інших функціональних станах організму, - гіпоталамус чи аденогіпофіз. Ми лише можемо констатувати, що ГАМК-рецептори обох цих структур приймають участь у регуляції кортикотропної функції ос-

танього. Безперечно, що відповідь на це питання була б дуже важливою для з'ясування іншого: про місцезнаходження первинного нейромедіаторного "дефекту" у структурах, які контролюють секрецію АКТГ, мозку людей при порушенні останньої, зокрема, при виникненні хвороби Іценка-Кушинга.

### Роль ГАМК-ергічної системи у регуляції функції ГТНС у хворих на хворобу Іценка-Кушинга

1. Значення центральної ГАМК-ергічної системи у механізмах регуляції функціонального стану ГТНС Складності у визначенні стану ГАМК-рецепторів або загалом ГАМК-ергічної системи мозку у хворих зрозумілі, а відсутність адекватної моделі на тваринах робить неможливим вивчення цього питання в експерименті. Тому ми вимушені були скористатися скісними показниками функціонального стану ГАМК-ергічної системи мозку у хворих на хворобу Іценка-Кушинга, а саме, визначенням вмісту ГАМК та активності ГДК у крові пацієнтів (J.Coffman et al., 1984; F.Petty et al., 1984; P.Subramaniam et al., 1988).

Ці параметри спочатку були з'ясовані у здорових людей. Встановлено, що визначення вмісту ГАМК у крові, напевно, більш відповідає поставленим цілям, бо активність ГДК у крові здорових осіб залежить від статі та віку, а у жінок - від фази менструального циклу. В подальшому цей висновок було підтверджено при обстеженні хворих: активність ГДК у плазмі крові хворих на хворобу Іценка-Кушинга не може бути об'єктивним критерієм, що характеризує функціональний стан центральної ГАМК-ергічної системи при цій патології, а знайдені зміни пов'язані, як ми вважаємо, з порушеннями статевої функції у пацієнтів з гіперкортицизмом.

Вміст ГАМК у плазмі крові хворих на хворобу Іценка-Кушин-

га знижений, особливо чітко це виявлялося у жінок, які не лікувалися. Рівень ГАМК у крові залежав від тривалості захворювання та віку пацієнток; середній вміст ГАМК у крові підвищувався при лікуванні та досягав норми у хворих, які перенесли тотальну адреналектомію і знаходилися на замісній гормональній терапії. Ці дані дозволили нам припустити, що у хворих на хворобу Іценка-Кушинга спостерігається певна недостатність функціонування центральних нейрохімічних систем з участю ГАМК. Крім того результати аналізу обстеження хворих свідчать про існування негативних зв'язків між рівнем АКТГ та ГАМК, або кортизолу та ГАМК у крові хворих на хворобу Іценка-Кушинга, при цьому у чоловіків вони більш виразні, ніж у жінок. У чоловіків та жінок існує різна залежність між вмістом ГАМК у крові та екскрецією 17-ОКС з сечею; у жінок присутня також позитивна кореляція між величиною добової екскреції 17-КС і вмістом ГАМК. Все це свідчить про певний вплив порушень регуляторних процесів, які контролюють менструальний цикл у жінок, на зв'язок між ГАМК-ергічною та гіпоталамо-гіпофізарною системами, а також доповнюють свідчення про участь ГАМК у регуляції репродуктивної функції.

При аналізі даних клінічного обстеження хворих на хворобу Іценка-Кушинга в залежності від рівня ГАМК у крові виявлено, що у пацієнтів-чоловіків рівень АТ знаходився у негативному зв'язку із вмістом ГАМК. В цьому плані треба відмітити, що в експериментах на щурах, яким одноразово або на протязі 7 діб вводили гідрокортизон, поряд із значним зниженням рівня ГАМК у плазмі крові, відмічено збільшення рівня АТ (В.Я.Кононенко и др., 1985). У літературі дискутується питання можливої участі ГАМК-ергічних процесів у регуляції різних механізмів, які контролюють АТ (T.Segura et al.,

1989; J.Wibble et al., 1989). У генезі стероїдної гіпертензії важливе місце займає система ренін-ангіотензин-альдостерон (P.Dugry, 1989), яка активується як у щурів з експериментальним гіперкортицизмом, так і у хворих з синдромом та хворобою Іценка-Кушинга (Л.М.Калинська та ін., 1993). Зважаючи на це, а також на дані про антагоністичні взаємовідносини між ГАМК-ергічною та ангіотензин-реніновою системами (V.Coiro et al., 1989), можна вважати, що ГАМК приймає участь у регуляції секреції вазопресину не тільки у нормі, а і в умовах стероїдної гіпертензії.

Вивчення можливого впливу деяких ГАМК-ергічних препаратів на стан ГНС у хворих на хворобу Іценка-Кушинга, зважаючи на висловлене припущення про існування певної недостатності функціонування нейрохімічних систем з участю ГАМК, свідчить, що ГАМК, вальпроєва кислота та фенібут здатні у різній мірі знижувати рівень АКТГ та кортизолу у крові хворих. При одноразовому прийомі ефект аміналону виявився нетривалим, фенібуту - нетривалим і незначним, а вальпроєвої кислоти - найбільш тривалим та суттєвим; останнє збігається з даними, які одержані в експерименті. В той же час довготривалий прийом аміналону хворими на хворобу Іценка-Кушинга виявив більш стійкий, ніж при одноразовому, ефект препарату, що, можливо, пов'язане із різним ступенем проникнення ГАМК у мозок та тривалістю дії амінокислоти. Треба відмітити, що у щурів при гіперфункції аденогіпофізу в умовах адреналектомії також спостерігали суттєве зниження рівня АКТГ при багаторазовому введенні ГАМК, на відміну від ефекту амінокислоти при одноразовому її введенні інтактним щурам, у яких гіперфункція аденогіпофізу була результатом стресорного впливу.

Зниження рівня АКТГ у крові хворих, поліпшення параметрів

енцефалографії у них при тривалому прийомі аміналону, а також свідчення літератури про його позитивний вплив на соматичний стан хворих (Б.М.Трубников, 1977), мозковий кровообіг, редукцію психо- та неврологічної симптоматики, при лікуванні гіпертензивних станів (И.Н.Тюренков, 1985) дозволяє рекомендувати зг тосування препарату у комплексній терапії хвороби Іценка-Кушинга, особливо у хворих, у яких спостерігали значний ефект при одноразовій пробі з вальпроєвою кислотою. Такі хворі становили близько 60% від загальної кількості обстежених. Для визначення групи хворих, яким може бути показане застосування у терапії аміналону (або інших ГАМК-ергічних препаратів), необхідно проводити такі проби з одноразовим прийомом вальпроєвої кислоти (вальпроату натрію) з подальшим визначенням у крові рівня АКТГ чи кортизолу.

Різде зниження вмісту АКТГ у крові пацієнтів, які перенесли тотальну адреналектомію в зв'язку з тяжкою формою хвороби, після прийому як аміналону, так і фенібуту підтверджує тезіс про зниження активності у них ГАМК-ергічної системи аденогіпофізу, що спостерігається у тварин після видалення надниркових залоз та постулюється для людини при хворобі Іценка-Кушинга та синдромі Нельсона, незважаючи на нормальний рівень у крові таких пацієнтів вмісту ГАМК. Більший ефект ГАМК-ергічних препаратів (особливо вальпроєвої кислоти) у пацієнтів з низьким рівнем ГАМК у крові також пояснюється передбачуваною недостатністю центральних ГАМК-ергічних механізмів у частини хворих на хворобу Іценка-Кушинга та можливим корегуючим впливом ГАМК та вальпроєвої кислоти на вміст ендogenousного медіатора у них. Залежність ефекту цих препаратів від рівня ГАМК у крові, можливо, є однією з причин тих суперечливих даних, які були одержані раніше у нечи-

сельних дослідженнях інших авторів по вивченню ефективності тривалого прийому вал'проату натрію хворими на хворобу Іценка-Кушинга.

## **2. Значення ГАМК-ергічної системи кори надниркових залоз у механізмах регуляції функціонального стану ГГНС**

Підвищення вмісту кортизолу у хворих з високим рівнем ГАМК у крові після прийому фенібуту може свідчити про прямий вплив фенільного похідного ГАМК на кору надниркових залоз у цих хворих. Можливо, що в цьому ефекті фенібуту певну роль відіграє ГАМК-ергічна система секреторних клітин. Це припущення не має доказів у літературі, так як немає, загалом, і доказів можливого значення периферичної ГАМК у регуляції функції кори надниркових залоз.

Поза межами цієї роботи ми з'ясували, що у корі надниркових залоз тварин синтез та рецепція ГАМК можуть залучатися до регуляції процесів стероїдогенезу (Т.М.Мішуніна та ін., 1994). З огляду на це, одержані дані вказують, що контроль активності ГГНС у хворих на хворобу Іценка-Кушинга при дії фенібуту може відбуватися не тільки на рівні центральних ГАМК-ергічних механізмів. На користь цього свідчать експериментальні дані про зниження вмісту кортикостерону у крові адреналектомованих щурів після тривалого введення фенібуту, а також вплив цього препарату і ГАМК на активність ГДК та зв'язування  $^{14}\text{C}$ -ГАМК плазматичними мембранами надниркових залоз при одночасному підвищенні рівня кортикостерону у крові. Крім того, зміни рецептування ГАМК плазматичними мембранами гіперплазованої тканини кори надниркових залоз хворих на хворобу Іценка-Кушинга можуть бути пов'язані з порушеннями механізмів секреції кортикостероїдів в умовах тривалої стимуляції її АКТГ. З'ясування значення периферичних

ГАМК-ергічних процесів у регуляції ГГНС потребує подальших поглиблених досліджень.

Отже, дані, які були одержані при виконанні цієї роботи, свідчать, по-перше, про значну роль ГАМК-ергічної системи у механізмах реалізації нейрохімічного впливу кортикостероїдів на мозок, що вбачається особливо важливим в умовах збільшення їх вмісту при стресі, при ятрогенному синдромі Іценка-Кушинга, а також за умов підвищення функції кори надниркових залоз при різних патологічних станах організму. По-друге, система ГАМК (особливо її рецепторні структури) має значення у контролі кортикотропної функції аденогіпофізу у нормі, при стресі або патології ГГНС; при цьому важливим може бути як гіпоталамічний, так і гіпофізарний рівень ГАМК-ергічної регуляції секреції АКТГ; не виключена і роль в цих процесах периферичної ГАМК-ергічної ланки. По-третє, враховуючи вищенаведене, порушення функціонування ГАМК-ергічної системи лімбічних структур мозку або аденогіпофізу при стресі, поряд з порушеннями функції інших нейромедіаторних систем, є однією з причин зривів регуляторних механізмів ГГНС та складають частку нейропатогенетичної основи виникнення хвороби Іценка-Кушинга.

### ВИСНОВКИ

1. Спектр змін обміну, транспорту та рецепції ГАМК у гіпоталамусі і гіпокампі щурів при дії гідрокортизону і АКТГ залежить від структури лімбічної системи, компартменту амінокислоти, тривалості дії гормонів та їх виду, вихідного гормонального стану організму.

2. Підвищення в організмі щурів рівня кортикостероїдів при одноразовому чи багаторазовому введенні гормонів призво-

дило до накопичення ГАМК у нервових закінченнях гіпоталамусу, внаслідок посилення синтезу амінокислоти з її попередників (глутамінової кислоти та путресцину); вивільнення ГАМК з синапсом підвищувалося при введенні АКТГ, а рецепція медіатора синаптичними мембранами - при одноразовому введенні гормонів, при багаторазовому введенні АКТГ вона знижувалася.

3. Вміст ГАМК у нервових закінченнях гіпокампу зростає за умов тривалого збільшення рівня кортикостероїдів в організмі за рахунок гальмування подальшого метаболізму амінокислоти та інтенсифікації її утворення з путресцину; при багаторазовому введенні гідрокортизону інтенсивність транспорту медіатора синаптичними мембранами підвищувалася в обох напрямках; вивільнення медіатора при одноразовому введенні АКТГ знижувалося, а при багаторазовому введенні - підвищувалося, рецепція ГАМК підвищувалася лише при введенні АКТГ.

4. Видалення надниркових залоз не впливало суттєво на обмін та рецепцію ГАМК у нервових закінченнях гіпоталамусу та гіпокампу; транспорт медіатора синаптичними мембранами інтенсифікувався в обох напрямках. Вміст ГАМК в аденогіпофізі шурів був знижений. Введення гідрокортизону адреналектомованим щурам приводило до нормалізації інтенсивності транспорту медіатора у синапсах гіпоталамусу та підвищувало його рецепцію синаптичними мембранами цієї структури, а також рівень амінокислоти в аденогіпофізі.

5. Підвищення рівня кортикостероїдів внаслідок введення гідрокортизону чи АКТГ зменшувало рівень ГАМК в плазмі крові інтактних та адреналектомованих шурів; зміни вмісту не корелювали із змінами активності ферментів обміну амінокислоти.

6. Одноразове введення гідрокортизону підвищувало кількість високоафінних, а багаторазове введення гормону зменшу-

вало кількість та спорідненість до ліганду низькоафінних ГАМК-рецепторів в аденогіпофізі щурів. Адреналектомія викликала протилежні за напрямком зміни кінетичних параметрів специфічного зв'язування  $^{14}\text{C}$ -ГАМК плазматичними мембранами аденогіпофізу, а введення гідрокортизону адреналектомованим щурам приводило до їх нормалізації.

7. ГАМК при одноразовому введенні збільшувала вміст АКТГ у крові інтактних, але не у крові стресованих щурів; багаторазове введення амінокислоти інтактним тваринам не змінювало, а адреналектомованим знижувало вміст гормону у крові. Підвищення рівня ендогенної ГАМК при введенні вальпроату натрію викликало зниження вмісту АКТГ у крові інтактних та адреналектомованих щурів.

8. Блокада ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів при введенні бікукулліну, всього комплексу ГАМК<sub>A</sub>/BD/CD<sup>-</sup>канал при введенні пікротоксину, а також активація ГАМК<sub>B</sub>-рецепторів при введенні баклофену підвищували рівень АКТГ у крові інтактних щурів при одноразовому введенні препаратів; у стресованих щурів зберігався ефект лише баклофену, а дія пікротоксину у стресованих і адреналектомованих тварин була протилежною такій у інтактних при одноразовому чи багаторазовому введенні препарату. Активація фенібут-чутливих ГАМК<sub>B</sub>-рецепторів викликала зниження рівня АКТГ у крові адреналектомованих, але не інтактних тварин. Бензодіазепіни знижували вміст АКТГ у крові інтактних, стресованих та адреналектомованих щурів.

9. ГАМК та її фенільний похідний змінювали активність ферменту синтезу ГАМК та рівень специфічного зв'язування медіатора плазматичними мембранами надниркових залоз щурів.

10. Вміст ГАМК у крові здорових осіб є сталим, а величина активності ферменту синтезу ГАМК залежить від статі та віку,

а у жінок - від фази менструального циклу.

11. У частини хворих на хворобу Іценка-Кушинга рівень ГАМК у крові знижений; виявлено кореляційний зв'язок між вмістом у крові ГАМК та рівнем АКТГ і кортизолу, вмістом у крові ГАМК та екскрецією гормонів надниркових залоз з сечею, а також рівнем ГАМК та величиною артеріального тиску у хворих. Специфічне зв'язування  $^{14}\text{C}$ -ГАМК плазматичними мембранами кори надниркових залоз у хворих з гіперкортицизмом підвищено.

12. Дія ГАМК, фенібуту та вальпроєвої кислоти на вміст АКТГ та кортизолу у плазмі крові хворих на хворобу Іценка-Кушинга залежить від вихідного рівня ГАМК у крові, тривалості прийому препаратів та стану хворих.

#### ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Для з'ясування індивідуального типу нейротрансмітерних порушень у хворих з гіперкортицизмом і вирішення питання про доцільність включення препаратів, що впливають на ГАМК-ергічну медіацію механізмів регуляції кортикотропної функції, необхідно проведення діагностичних проб з одноразовим прийомом вальпроату натрію (конвулекс, депакін, епілім, аседипрол) у середній або вищій терапевтичній дозі з подальшим визначенням у крові рівня АКТГ або кортизолу. При позитивній гормональній реакції (зниження рівня гормонів через 60-120 хв після прийому) хворим показано, за рішенням лікаря, включення до комплексної терапії препаратів ГАМК-ергічної дії.

#### ПЕРЕЛІК ПУБЛІКАЦІЙ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Захват гамма-аминомасляной кислоты и активность глутаматдекарбоксилазы в синапсоммах различных отделов мозга крыс при адrenaлeктомии и последующем введении гидрокортизо-

на // Укр. биохим. ж. - 1983. - 55, N 6. - С. 647 - 651 (соавт.: В.Я.Кононенко).

2. Спектр свободных аминокислот гипофиза крыс при адrenaлэктомии и введении гидрокортизона // Докл. АН УССР. - 1985. - N 3. - С. 72 - 74.

3. Участие гамма-аминомасляной кислоты в регуляции секреции кортикотропина у крыс // Физиол. ж. - 1985. - 31, N 3. - С. 321 - 326 (с авт.: В.Я.Кононенко, Е.В.Луцицкий).

4. Содержание гамма-аминомасляной кислоты и активность глутаматдекарбоксилазы в плазме крыс и адоовых людей // Вопр. мед. химии. - 1990. - N 2. - С. 22 - 24.

5. Транспорт гамма-аминомасляной кислоты синапсосами гипоталамуса и гиппокампа крыс при изменении уровня кортикостероидов в организме // Докл. АН УССР. - 1990. - N 10. - С. 63 - 66 (соавт.: В.Я.Кононенко).

6. Гормональный контроль обмена ГАМК в гипоталамусе и гиппокампе крыс // Укр. биохим. ж. - 1990. - 62, N 6. - С. 71 - 80 (соавт.: В.Я.Кононенко).

7. Полиамины гипоталамуса и гиппокампа при изменении уровня кортикостероидов в организме крыс // Физиол. ж. - 1991. - 37, N 1. - С. 63 - 69 (соавт.: В.Я.Кононенко).

8. Специфическое связывание  $^3\text{H}$ -гамма-аминомасляной кислоты в гипоталамусе и гиппокампе крыс после адrenaлэктомии и введения гидрокортизона и кортикотропина // Бюлл. эксперим. биол. и мед. - 1991, N 1. - С. 42 - 43 (соавт.: В.Я.Кононенко).

9. ГАМК - ингибитор секреции кортикотропина // Эндокринология. - Киев: Здоров'я, 1991: - вып. 21. - С. 119 - 125.

10. Образование гамма-аминомасляной кислоты из глутамата и путресцина в синапсосах гипоталамуса и гиппокампа крыс и регуляция этих процессов глюкокортикоидами // Биохимия. - 1991. - 56, N 5. - С. 846 - 853 (соавт.: В.Я.Кононенко).

11. Влияние ГАМКергических препаратов на функциональное состояние гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы у больных болезнью Иценко-Кушинга // Пробл. эндокринологии. - 1991. - 37, N 4. - С. 28 - 31 (соавт.: В.Я.Кононенко, И.В.Комиссаренко, Е.В.Луцицкий).

12. Содержание гамма-аминомасляной кислоты в плазме крови больных болезнью Иценко-Кушинга и его зависимость от

клинических и гормональных показателей // Терап. архив. - 1991. - 63, N 10. - С. 63 - 66 (соавт.: В.Я.Кононенко, И.В.Комиссаренко).

13. Rat adenohipopyseal GABA-receptors under changes of corticosteroid level // J. Endocrinol. Invest. - 1991. - 14, Suppl. 4-6. - P. 89 - 89.

14. Кинетические параметры рецепторного связывания  $^{14}\text{C}$ -ГМК мембранами аденогипофиза крыс в условиях моделирования различного уровня кортикостероидов и АКГГ в организме // Пробл. эндокринолог. - 1993. - 39, N 6. - С. 43 - 46 (соавт.: В.Я.Кононенко).

15. Содержание некоторых нейромедиаторов в гипоталамусе, гиппокампе и гипофизе крыс при адrenaлeктомии и последующем введении гидрокортизона // Пробл. эндокринолог. - М., 1984. - 9 с. - Деп. в ВИНТИ N 6936 - 84Деп (соавт.: В.Я.Кононенко, Т.А.Петракова).

16. Содержание гамма-аминомасляной кислоты и активность ферментов ее обмена в плазме крови крыс при моделировании различного уровня кортикостероидов в организме и в плазме крови больных болезнью Иценко-Кушинга // Патол. физиол. и экспер. терап. - М. 1991. - 11 с. - Деп. в ВИНТИ N 4107-В91.

17. Применение проб с однократным приемом вальпроата натрия для характеристики нарушений ГАМК-ергических механизмов регуляции кортикотропной функции аденогипофиза у больных болезнью Иценко-Кушинга // Метод. письмо. - Киев, 1992. - в. 4. - 2 с. (соавт.: В.Я. Кононенко, И.В.Комиссаренко).

18. Изменение метаболизма ГАМК в гипоталамусе и гиппокампе и функциональное состояние гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы у крыс под влиянием некоторых фармакологических препаратов // [Тез.] Всес. конференция по нейроэндокринологии, Харьков, 1988. - Л., 1988. - С. 162 - 162.

19. ГАМК-ергические механизмы развития нейроэндокринных реакций при стрессе // Стресс, адаптация и дисфункции: [Тез.] IY Всес. симпозиум, Кишинёв. - Кишинёв, 1991. - С. 185 - 185 (соавт.: В.Я.Кононенко).

Матеріали дисертації викладені, крім того, ще у 18 тезах міжнародних, всесоюзних та республіканських з'їздів, конференцій та симпозиумів.

### ANNOTATION

Mishunina T.M. Role of GABAergic mechanisms in the effect of hormone of hypothalamic-adenohypophyseal-adrenocortical system on the brain and in regulation of the functional state of various structures of this system in health and disease.

Dissertation for the degree of Doctor of Biological Science; speciality 14.00.03 - endocrinology; V.P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, 1994.

Dissertation contains the results of experimental and clinical studies on participation of the CNS inhibitory mediator in the mechanisms of ACTH and corticosteroid effects on the brain limbic structures, its role in the regulation of hypophyseal corticotropic function in health and hypercorticism. It has been shown that all neurochemical processes which ensure functioning of GABAergic system are involved in hormone actions on the brain. The main structures participating in GABAergic control of corticotropic function in health and hypercorticism are hypothalamic and adeno-hypophyseal GABA-receptors, structures of GABA<sub>A</sub>-receptor complex in particular. Abnormal decrease of GABAergic system activity in people is a component of neuropathogenetic basis for Icenko-Cushing's disease; pharmacologic correction with GABAergic drugs may be of use in the treatment of this disease.

### АННОТАЦІЯ

Мишунина Т.М. Роль ГАМК-ергических механизмов во влиянии гормонов системы гипоталамус-аденогипофиз-кора надпочечников на мозг и в регуляции функционального состояния различных её звеньев в условиях нормы и патологии.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.00.03 - эндокринология; Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко АМН Украины, Киев, 1994.

Диссертация содержит результаты экспериментальных и клинических исследований участия тормозного медиатора ЦНС в механизмах воздействия АКГГ и кортикостероидов на лимбические

структуры мозга, а также его роли в регуляции кортикотропной функции гипофиза в норме и при гиперкортицизме. Показано, что все нейрохимические процессы, обеспечивающие функционирование ГАМК-ергической системы, вовлечены в реализацию действия гормонов на мозг. Основными звеньями, которые участвуют в механизмах ГАМК-ергического контроля кортикотропной функции в норме и при гиперкортицизме являются ГАМК-рецепторы гипоталамуса и аденогипофиза, в частности, структуры ГАМК<sub>A</sub>-рецепторного комплекса. Патологическое снижение активности ГАМК-ергической системы у людей является частью нейрпатогенетической основы болезни Иценко-Кушинга; фармакологическая коррекция ГАМК-ергическими препаратами может быть полезной при лечении этого заболевания.

Ключові слова: глюкокортикоїди, АКТГ, гіперкортицизм, мовок, гамма-аміномасляна кислота, механізми регуляції

Підл. до друку 27.12.44 Формат 60x84/16 Папір друк. Друк. офс.  
Друк. офс. Умовн. друк. арк. 2, В. Обл.-вил. арк. 2,0 Тир. 100.  
Зам. 4-4072

Київська книжкова друкарня наукової книги. Київ, Б. Хмельницького, 19.

APR 31 1955

456520

AB 31.703