
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GENNARO DELLA PIETRA, GENNARO ILLIANO, VITTORIO
CAPANO, RICCARDO RAVA

**Conversione in vivo dell'ac. γ -idrossibutirrico in ac.
 γ -aminobutirrico (GABA)**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 38 (1965), n.5, p. 737-740.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_38_5_737_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Biochimica. — *Conversione in vivo dell'ac. γ -idrossibutirrico in ac. γ -aminobutirrico (GABA)* (*). Nota di GENNARO DELLA PIETRA, GENNARO ILLIANO, VITTORIO CAPANO e RICCARDO RAVA, presentata (**) dal Corrisp. F. CEDRANGOLO.

Nel 1953 Bessman e coll. [1] e Roberts e coll. [2] dimostrarono la presenza nel cervello dei mammiferi di una reazione reversibile di transaminazione tra acido γ -aminobutirrico ed acido α -chetoglutarico.

Il destino metabolico della semialdeide succinica, formata nella transaminazione, era chiarito da Albers e coll. [3] che evidenziavano nel cervello dei mammiferi una specifica deidrogenasi, DPN⁺ dipendente, capace di ossidare la semialdeide succinica ad acido succinico. Questa reazione rendeva anche conto dell'effetto attivante dell'acido γ -aminobutirrico sul consumo di O₂ da parte dei mitocondri di cervello [4], e chiariva il ruolo dell'acido γ -aminobutirrico come via alternativa per la formazione di acido succinico per il ciclo tricarbossilico di Krebs [5] nel cervello.

Nel 1960 ricerche di Niremberg e coll. [6], avendo dimostrato in alcuni batteri una reazione reversibile di ossidazione dell'acido γ -idrossibutirrico a semialdeide succinica, mettevano in discussione la questione dell'eventuale presenza di una via riduttiva della stessa semialdeide succinica anche nell'organismo dei mammiferi. Ricerche di Bessman e coll. [7, 8, 9] sembravano in accordo con l'esistenza di una tale via metabolica in quanto dimostravano la presenza nel sistema nervoso di mammiferi di notevoli quantità di acido γ -idrossibutirrico. Poiché questo composto è apparentemente l'unico, tra quelli presenti in condizioni fisiologiche nel sistema nervoso, che sia provvisto di attività anestetica [10], appariva interessante studiare il meccanismo della sua formazione. Ricerche di Fishbein e coll. in tal senso [9] dimostravano, nella frazione solubile di omogenato di cervello, la presenza di un enzima DPN⁺ dipendente capace di operare la riduzione della semialdeide succinica ad acido γ -idrossibutirrico; l'enzima appariva indistinguibile dalla lattico-deidrogenasi. L'acido γ -idrossibutirrico era successivamente lattonizzato a γ -butirrolattone.

Considerando l'importanza delle ricerche fin qui esposte, ci è parso interessante studiare l'effetto della somministrazione *in vivo* di acido γ -idrossibutirrico sul tasso di acido γ -aminobutirrico del cervello di ratto.

La dimostrazione di un eventuale aumento dell'acido γ -aminobutirrico nel sistema nervoso degli animali trattati con acido γ -idrossibutirrico poteva indicare una diretta conversione dello scheletro carbonioso dell'acido γ -idrossibutirrico nell'acido γ -aminobutirrico attraverso la catena di reazioni seguenti:

(*) Lavoro eseguito con un contributo del C.N.R. (Impresa Enzimologia).

(**) Nella seduta dell'8 maggio 1965.

ac. γ -idrossibutirrico $\xrightarrow{\text{DPN}^+}$ semialdeide succinica $\xrightarrow{\text{transaminazione}}$ ac. γ -aminobutirrico.

D'altra parte, considerando l'effetto inibitore dell'acido γ -aminobutirrico a livello delle sinapsi interneuroniche centrali, un eventuale aumento del tasso cerebrale di questo aminoacido indotto dalla somministrazione di acido γ -idrossibutirrico, avrebbe potuto anche rendere conto dell'effetto sedativo ed anestetico di quest'ultimo composto.

PARTE SPERIMENTALE.

Le ricerche sono state condotte su ratti albini di ceppo italoico dal peso medio di g 200 in condizioni ottimali di stabulazione e di alimentazione. Gli animali a digiuno da 12 h ricevevano per via endoperitoneale 500 mg/Kg di

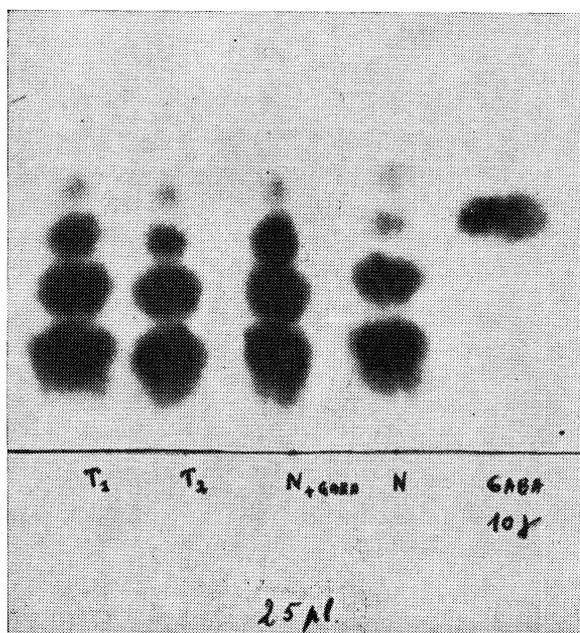


Fig. 1. - Elettroforesi su carta di estratto di cervello di ratto (25 μ l).

N = Controllo; T₁—T₂ = cervello di ratto trattato per via endoperitoneale con 500 mg/kg di acido γ -idrossibutirrico e sacrificato 2 h dopo l'iniezione; N+GABA = Controllo+200 μ g di GABA aggiunti per g di cervello (peso fresco) dopo deproteinizzazione.

acido γ -idrossibutirrico. Dopo 2 h dall'iniezione⁽¹⁾ gli animali erano uccisi per decapitazione e il cervello, rapidamente prelevato, era omogenizzato a freddo con alcool al 70 % (20 ml di alcool/g di cervello). Si centrifugava e il soprannatante era estratto con 10 ml di cloroformio allo scopo di allontanare

(1) Gli animali erano sacrificati dopo 2 h poiché proprio alla seconda ora dalla iniezione endoperitoneale si ha la massima concentrazione di acido γ -idrossibutirrico nel cervello [8].

i lipidi presenti. La fase idro-alcoolica era prelevata, misurata e portata a secco sotto vuoto a 40° C; il residuo veniva ripreso con 1 ml di H₂O per ogni g di peso fresco di cervello. Per l'identificazione dell'acido γ -aminobutirrico (GABA) ci siamo serviti di tecniche elettroforetiche a basso voltaggio e di tecniche cromatografiche. Per la separazione cromatografica 50 μ l del residuo, ripreso con H₂O erano cromatografati su carta Whatman n. 1: cromatografia discendente monodimensionale, usando come solvente fenolo saturo di acqua o butanolo-ac. acetico-H₂O (4:1:5). Per la separazione elettroforetica si usavano 25 o 50 μ l della soluzione acquosa del residuo; carta Whatman n. 1, puffer piridina-ac. acetico-H₂O (250:50:900), pH 6; tempo di corsa: 1 h e 30'; 12 V/cm. Per la colorazione degli elettroferogrammi e dei cromatogrammi si utilizzava ninidrina 0,1% in butanolo.

Parallelamente alla prova con cervello di ratti trattati per via endoperitoneale con acido γ -idrossibutirrico, si facevano correre sui cromatogrammi e sugli elettroferogrammi, estratti ottenuti nelle medesime condizioni sperimentali da cervello di ratti inoculati per via endoperitoneale con NaCl 0,9%. Per l'esatta identificazione della posizione dell'acido γ -aminobutirrico e per l'allestimento di prove di recupero, si facevano correre sui cromatogrammi e sugli elettroferogrammi anche estratti di cervello di ratti normali addizionati con acido γ -aminobutirrico (200 μ g/g di cervello). Per la valutazione quantitativa dei risultati ottenuti, le strisce elettroforetiche venivano lette al densitometro «Chromoscan». I valori ottenuti erano interpolati con quelli di una curva standard ottenuti dalla lettura, nelle medesime condizioni sperimentali, di elettroferogrammi allestiti con quantità note di acido γ -aminobutirrico da 5 a 20 μ g.

I risultati ottenuti sia con tecnica elettroforetica sia con tecnica cromatografica dimostrano un evidente aumento del tasso di acido γ -aminobutirrico nel cervello degli animali trattati per via endoperitoneale con γ -idrossibutirrico. Un tipico elettroferogramma è riportato in fig. 1.

I risultati delle analisi quantitative sono riportati in Tabella I.

TABELLA I.

Effetto della somministrazione in vivo di acido γ -idrossibutirrico sul tasso di acido γ -aminobutirrico del cervello.

	μ mol di acido γ -aminobutirrico/g di cervello (peso fresco)
Ratti normali	2,2
Ratti trattati con ac. γ -idrossibutirrico (500 mg/kg per endoperitoneo)	3,0

I risultati riportati nella tabella dimostrano che l'iniezione di ac. γ -idrossibutirrico provoca un aumento del tasso di ac. γ -aminobutirrico nel cervello di ratto del 36%, indicando pertanto una evidente conversione dell'ac. γ -idrossibutirrico nell'ac. γ -aminobutirrico.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] S. P. BESSMAN, J. ROSSEN e E. C. LAYNE, « J. Biol. Chem. », 385, 201 (1953).
- [2] E. ROBERTS, H. M. BREGOFF, « J. Biol. Chem. », 393, 201 (1953).
- [3] R. W. ALBERS, R. A. SALVADORE, « Science », 359, 128 (1958).
- [4] B. SACKTOR, L. PACKER, J. CUMMINS e B. E. HACKLEY, in *Inhibition in the nervous system and γ -amino-butirric acid*; E. Roberts ed. Pergamon Press, 182 (1960).
- [5] E. ROBERTS, in *Progress in Neurobiology. - I. Neurochemistry*, p. 11 (S. R. Korey e J. I. Nurnberger ed.) Hoerber, New York (1956).
- [6] M. V. NIREMBERG, W. B. JAKOBY, « J. Biol. Chem. », 954, 235 (1960).
- [7] S. P. BESSMAN, W. B. FISHBEIN, « Federation Proc. », 334, 22 (1963).
- [8] S. P. BESSMAN, S. J. SKOLNIK, « Science », 1045, 143 (1964).
- [9] W. N. FISHBEIN, S. P. BESSMAN, « J. Biol. Chem. », 357, 239 (1960).
- [10] H. LABORIT, J. M. JOUANY, J. GERARD, F. FABIANI, « Presse Med. », 1867, 68 (1960).
- [11] E. FLOREY, *Inhibition in the nervous system and γ -amino-butirric acid*. E. Roberts ed., Pergamon Press, p. 74 (1960).

SUMMARY. — γ -Hydroxybutyrate, when injected intraperitoneally in rats, increases the content of γ -aminobutyrate in brain.

γ -Aminobutyrate was separated by paper electrophoresis and chromatography; for quantitative measurement a Chromoscan apparatus was used for reading the paper strips. The results may in part explain the mechanism of γ -hydroxybutyrate anesthetic activity.