

АКТИВАЦІЯ ПРЕСІНАПТИЧНИХ ІОНОТРОПНИХ ГЛУТАМАТНИХ РЕЦЕПТОРІВ СТИМУЛЮЄ ВИВІЛЬНЕННЯ ГАМК ІЗ НЕРВОВИХ ТЕРМІНАЛЕЙ ГІПОКАМПА І КОРИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ

О. О. КРУПКО, А. С. ТАРАСЕНКО, Н. Г. ГІММЕЛЬРЕЙХ

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: olya_krupko@mail.ru

Одним із механізмів тонкої регуляції нейросекреторного процесу в нервових терміналях є активація пресинаптичних рецепторів. Метою дослідження було визначити: як активація пресинаптичних глутаматних рецепторів впливає на секрецію гальмівного нейротрансмітера ГАМК, які типи іонотропних рецепторів залучені до модуляції цього процесу та за яким механізмом реалізується такий вплив. Показано, що специфічні агоністи глутаматних рецепторів, кайнат та НМДА, так само як і глутамат, стимулюють вивільнення $[^3H]$ ГАМК із нервових терміналей кори та гіпокампа мозку щурів, що свідчить про залучення обох типів рецепторів у модуляцію секреції ГАМК. Встановлено, що відповідь терміналей на активацію кайнатних та НМДА-рецепторів опосередкована стимуляцією процесу екзоцитозу, а не вивільнення нейротрансмітера із цитозольного пулу, на що вказує неспроможність NO-711 (специфічного блокатора транспортерів ГАМК) блокувати цей процес. Таким чином, активація пресинаптичних іонотропних глутаматних рецепторів модулює силу синаптичної відповіді за рахунок зміни вірогідності вивільнення нейромедіатора із нервових терміналей.

Ключові слова: пресинаптичні іонотропні глутаматні рецептори, вивільнення ГАМК, нервові терміналі, екзоцитоз.

Згідно з класичним уявленням, передача інформації від одного нейрона до іншого є односпрямованою послідовністю подій, яка включає в себе вивільнення нейротрансмітера із пресинаптичної терміналі в синаптичну щілину, активацію рецепторів постсинаптичної мембрани та розповсюдження потенціалу дії в клітині-мішені. Ефективність синаптичної передачі залежить від низки факторів, а саме концентрації трансмітера у везикулах, вірогідності його вивільнення, геометрії синапсу та кількості і локалізації в ньому рецепторів. Проте ідентифікація рецепторів нейротрансмітерів на пресинаптичній мембрані змусила переглянути односпрямованість передачі інформації і показала важливу роль пресинаптичних рецепторів у регуляції синаптичної передачі. Якщо активація постсинаптичних рецепторів призводить до зміни збудливості нейрона, активація пресинаптичних рецепторів може забезпечувати тривалі зміни сили міжнейрональних взаємодій за рахунок інгібування чи стимуляції вивільнення медіаторів із нервових закінчень [1, 2].

У дослідженнях короткотривалої і довготривалої синаптичної пластичності го-

ловна роль відводиться рецепторам глутамату, основного збуджуючого нейромедіатора, що широко розповсюджений в центральній нервовій системі [3]. Показано, що пресинаптичні глутаматні рецептори локалізовані як на глутаматергічних, так і на ГАМК-ергічних нервових терміналях переважно поблизу сайтів вивільнення нейротрансмітерів [4–6]. Джерелом глутамату для активації цих рецепторів може бути безпосередньо нервове закінчення, на якому експресовані рецептори, сусідні близько розміщені синаптичні щілини або гліальні клітини. Активація рецепторів впливає на вірогідність вивільнення нейромедіатора із пресинапсу та може спричинювати як пригнічення, так і посилення ефективності нейропередачі [5–8]. Такі протилежні ефекти, можливо, пов'язані з тим, що різні типи рецепторів асоційовані з різними сигнальними системами [9, 10].

До недавнього часу вважалося, що основними регуляторами вивільнення нейротрансмітера з нервової терміналі є пресинаптичні метаботропні рецептори, які пов'язані з G-протеїнами [11], тоді як іонотропні рецептори задіяні виключно в

постсинаптичних процесах. На сьогодні завдяки численним дослідженням ця точка зору зазнала змін, зокрема було достовірно показано пресинаптичну локалізацію глутаматних іонотропних рецепторів [12], які модулюють нейросекреторний процес внаслідок відкриття спряжених з ними лігандзалежних каналів [13, 14]. Ці рецептори за аналогією з постсинаптичними одержали назви – НМДА (N-метил- α -аспартат), АМПА (α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазол-пропіонат) та каїнатні – відповідно до специфічних агоністів, що їх активують.

Дані літератури щодо впливу пресинаптичних іонотропних глутаматних рецепторів на ГАМК-ергічну передачу досить суперечливі, оскільки показано як посилення [6, 15], так і пригнічення вивільнення ГАМК за їхньої активації [8, 16]. Ці дані було одержано, головним чином, в електрофізіологічних експериментах, де основним критерієм оцінки активації пресинаптичних рецепторів були зміни частоти струмів, що реєструвалися на постсинаптичних нейронах. Такий підхід пояснюється складністю проведення прямих вимірів на пресинапсі, виходячи з невеликого розміру більшості нервових терміналей. На думку авторів таких досліджень, модуляція вивільнення нейромедіатора із пресинапсу полягає в посиленні/пригніченні індукованого чи спонтанного екзоцитозу [17–19]. Проте біохімічні і фармакологічні дослідження на препаратах очищених нервових терміналей показали можливість вивільнення нейромедіаторів іншим шляхом – із цитоплазматичного пулу за рахунок реверсної роботи транспортерів нейромедіаторів [20–22].

Метою нашого дослідження було визначити, як активація пресинаптичних глутаматних рецепторів впливає на секрецію гальмівного нейротрансмітера ГАМК, які типи іонотропних рецепторів залучені до модуляції цього процесу та за яким механізмом реалізується такий вплив. У роботі були використані ізольовані із гіпокампа та кори мозку шурів нервові терміналі (синаптосоми), які є адекватною та зручною моделлю для вивчення пресинаптичних процесів. Такі структури виявляють високий рівень метаболічної компетентності, що дозволяє не лише оцінити рівень секреторної відповіді, а й підійти до інтерпретації внутрішньоклітинних процесів, які лежать в їхній основі. Ми оцінювали вивільнення міченої γ -аміномасляної кислоти (^3H ГАМК) з нервових терміналей у відповідь на аплікацію як екзогенного глута-

мату, природного агоніста всіх типів глутаматних рецепторів, так і специфічних агоністів глутаматних рецепторів НМДА та АМПА/каїнатного типів.

Матеріали і методи

Всі досліди було виконано згідно з «Правилами проведення робіт із використанням експериментальних тварин», затверджених Комісією Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України з догляду, утримання і використання експериментальних тварин.

Одержання синапсом із тканин кори і гіпокампа головного мозку шурів. У дослідях використовували білих шурів-самців лінії Вістар масою 150–200 г. Після декапітації у тварин негайно вилучали мозок, швидко виділяли гіпокамп та кору великих півкуль і гомогенізували ці зразки за допомогою скляного гомогенізатора Поттера (зазор 0,2 мм) в охолодженому середовищі такого складу: 0,32 М сахарози, 0,2 мМ EDTA, 5 мМ HEPES (рН 7,4). Одержані гомогенати центрифугували 5 хв при 2 500 g для осадження клітинних ядер, фрагментів кровоносних судин та відносно великих фрагментів нервових і гліальних клітин. Надосадові фракції центрифугували 12 хв при 12 000 g. Одержані осадки розглядалися як фракції неочищених синапсом. Всі операції проводили на холоді (0–4 °С).

Для одержання фракції очищених синапсом осад після попереднього центрифугування (при 15 000 g) ресуспендували в середовищі виділення і центрифугували 45 хв при 70 000 g у градієнті щільності фіколу (4, 6, 13%). Фракцію, одержану в інтерфазі між 6 і 13% фіколу, збирали, розводили середовищем виділення 1:4 і центрифугували 20 хв при 15 000 g. Осад, який містив у собі в основному фракцію очищених синапсом [23], суспендували в охолодженому оксигенованому стандартному сольовому розчині наступного складу (в мілімолях на 1 л): NaCl – 126; KCl – 5; MgCl₂ – 1,4; NaH₂PO₄ – 1; HEPES – 20 (рН 7,4); CaCl₂ – 1 мМ; d-глюкоза – 10; піруват – 4. Додавання пірувату сприяло підвищенню стабільності синапсомного препарату та акумуляції більшої кількості ГАМК у синаптичних везикулах (24).

Концентрацію протеїну визначали за методом Лоурі в модифікації Ларсона [25].

Визначення вивільнення ^3H ГАМК. Попередні досліди, проведені на фракціях очищених і неочищених синапсом, показали, що в обох препаратах процеси відбуваються з однаковою закономірністю. Це дозволило в

подальшому скоротити процедуру одержання об'єкта дослідження і використовувати як основний препарат неочищені синаптосоми.

Синаптосоми (2 мг протеїну/мл) після преінкубації в оксигенованому стандартному сольовому розчині при 37 °С навантажували міченою ГАМК (^3H ГАМК, 50 нМ) протягом 10 хв. Під час проведення всіх процедур, що забезпечують навантаження синапсом ^3H ГАМК і вивільнення останньої, сольовий розчин містив інгібітор трансамінази ГАМК – амінооксиоцтову кислоту в концентрації 100 мкМ. Після навантаження суспензію синапсом охолоджували на льоду протягом 5 хв, розводили в 10 разів охолодженим оксигенованим сольовим розчином, центрифугували 10 хв при 4 000 g, а осад ресуспендували в сольовому розчині таким чином, щоб кінцева концентрація протеїну складала 1 мг/мл. Одержану суспензію синапсом негайно використовували для проведення дослідів. Вивільнення ^3H ГАМК із синапсом вимірювали наступним чином: аліквоти суспензій (120 мкл) преінкубували 10 хв при 37 °С, через 1; 1,5; 3; 5 та 10 хв після додавання агентів, що стимулювали вивільнення ^3H ГАМК, проби швидко центрифугували в мікроцентрифузі (15 сек при 10 000 g) і відбирали 90 мкл супернатанта для вимірювання рівня радіоактивності. В експериментах використовували сцинтиляційну рідину ACS. Радіоактивність вимірювали, використовуючи лічильник «Tracor Analytic Delta 300» (США). Рівень вивільнення ^3H ГАМК із синапсом без додавання стимулюючих агентів приймали за базальний. Стимульоване вивільнення розраховували як різницю між вивільненням ^3H ГАМК під дією стимулюючих агентів і базальним вивільненням. Вміст ^3H ГАМК в супернатантах виражали як нормовану величину, приймаючи загальний вміст ^3H ГАМК у синаптосомах за 100%. Числові значення представлено як середнє \pm помилка середнього. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Стьюдента.

В дослідях було використано такі матеріали і реактиви: ^3H ГАМК (89 Кі/моль) та сцинтиляційна рідина ASC (Amersham, Велика Британія); сахароза (Merck, Німеччина); 4-амінопіридин (RBI, США); фікол-400, амінооксіацетат, d-глюкоза, тетродотоксин, гліцин, L-глутамат, НМДА, каїнат, NO-711, МК-801 і NEPES (Sigma, США); конканавалін А (Serva, Німеччина). Інші реактиви – вітчизняного виробництва категорії хч (Реахім, Україна).

Результати та обговорення

Вплив глутамату на вивільнення ^3H ГАМК із синапсом гіпокампа мозку щурів. Для з'ясування впливу активації пресинаптичних глутаматних рецепторів на ГАМКергічну нейрорепердачу ми вимірювали кальційзалежне вивільнення ^3H ГАМК із синапсом, попередньо навантажених нейромедіатором, у відповідь на додавання глутамату. Ефективність впливу глутамату оцінювали, порівнюючи його дію з дією 4-амінопіридину (4-АП) – блокатора калієвих каналів, який, спричинюючи деполяризацію терміналей, стимулює процес екзоцитозу [26]. Відповідь синапсом на аплікацію 4-АП слугувала контролем для оцінки функціонального стану нервових терміналей. Як видно з рис. 1, А, додавання глутамату (0,5 мМ) до гіпокампних синапсом стимулювало вивільнення ^3H ГАМК, кількість якого була лише вдвічі меншою за кількість нейромедіатору, що вивільнювався у відповідь на 4-АП (1 мМ). У разі зниження концентрації глутамату від 1 мМ до 0,5 мМ вивільнення ^3H ГАМК зменшувалося в середньому з $3,95 \pm 0,81$ до $1,73 \pm 0,38$, що свідчить про додозалежність дії глутамату.

Вивільнення нейромедіатору із пресинаптичної терміналі, як відомо, може відбуватися з везикулярного чи цитозольного пулу завдяки реалізації різних механізмів. У першому випадку це буде результатом стимуляції процесу екзоцитозу, а в другому – функціонування трансмембранного транспортера в реверсному режимі, внаслідок чого переносник буде транспортувати нейромедіатор у зворотному напрямку: з цитозолу до позаклітинного середовища. Щоб з'ясувати, який саме механізм реалізується у разі активації пресинаптичних глутаматних рецепторів, ми дослідили кінетику вивільнення ^3H ГАМК за дії глутамату у присутності та за відсутності в середовищі інкубації NO-711 специфічного несубстратного інгібітора транспортерів ГАМК. Вивільнення ГАМК оцінювали на 2-й, 5-й та 10-й хв після внесення глутамату. На рис. 1, Б видно, що за відсутності NO-711 (30 мкМ) максимальне підвищення позаклітинного рівня нейротрансмітера спостерігається на 2-й хв, після чого кількість ^3H ГАМК у позаклітинному середовищі поступово зменшується і наближається до вихідного значення (на 10-й хв). У присутності NO-711 різке підвищення рівня ^3H ГАМК у позаклітинному середовищі через 2 хв після додавання глутамату зберігалось, але наступного зменшення рівня ^3H ГАМК не відбувається. Харак-

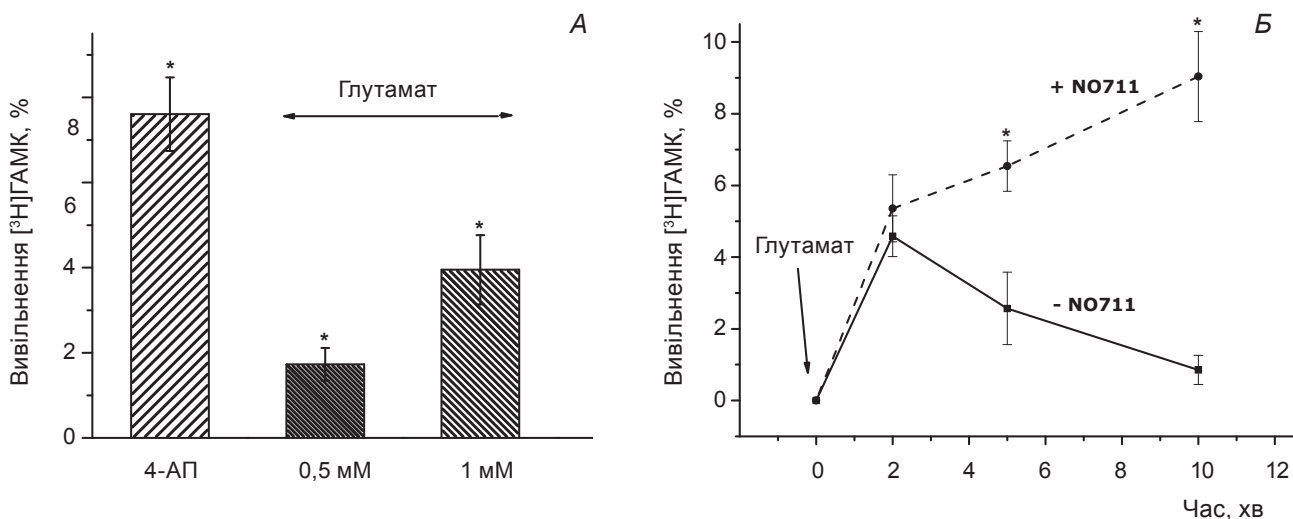


Рис. 1. Глутаматіндуковане вивільнення $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ (%) із нервових терміналей гіпокампа. А – Вивільнення $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ за дії 4-амінопіридину (2 мМ) та глутамату (0,5 і 1 мМ), * $P < 0,05$ порівняно з контролем. Б – Кінетика вивільнення $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ під впливом 1 мМ глутамату в нормі і у присутності 30 мкМ NO-711 ($n = 6$), * $P < 0,05$ порівняно з NO-711

тер секреторної відповіді – різке підвищення вивільнення на 2-й хв, що зберігається у присутності блокатора транспортерів, дозволяє припустити, що екзогенний глутамат стимулює саме процес екзоцитозу, а не вивільнення нейротрансмітера з цитозольного пулу. Той факт, що у присутності NO-711 не спостерігається наступного зниження позаклітинного ГАМК свідчить на користь припущення, що зниження позаклітинного ГАМК у контролі обумовлено саме роботою транспортерів.

Таким чином, одержані результати вказують на те, що екзогенний глутамат спричинює дозозалежне вивільнення гальмівного нейротрансмітера із везикулярного пулу нервових терміналей, стимулюючи, тим самим, ГАМК-ергічну нейропередачу.

Вплив каїнату на вивільнення $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ із синапсом гіпокампа мозку щурів. Глутаматіндукована стимуляція ГАМК-ергічної трансмісії може бути обумовлена активацією різних типів глутаматних рецепторів, що експресовані на пресинапсі. Так, у системі іонотропних глутаматних рецепторів є три типи рецепторів: НМДА, каїнатні та АМПА, що пов'язані з катіонселективними іонними каналами та забезпечують Na^+ -, K^+ - та Ca^{2+} -провідність. Для ідентифікації залучення конкретного типу рецепторів до розвитку глутаматіндукованої відповіді ми скористалися специфічними агоністами та антагоністами різних типів рецепторів.

Як показали наші експерименти, каїнат, так само як і глутамат, стимулює вивільнення $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ із нервових терміналей гіпокампа мозку щурів. Ефективність його дії зростає в діапазоні концентрацій від 250 нМ до 2,5 мкМ, проте подальше підвищення концентрації агоніста не змінює його ефективності (дані не наведено). Слід зазначити, що, хоча каїнат виявляє істотну преференцію стосовно каїнатного типу рецепторів, цей агоніст може у значній мірі активувати також АМПА-рецептори. За різними оцінками афінність каїнатних рецепторів до каїнату лише в 5–30 разів вища по відношенню до АМПА-рецепторів. Так само класичні антагоністи АМПА/каїнатних рецепторів, CNQX та NBQX, показують у кращому разі 3–5-кратну селективність до каїнатних рецепторів порівняно з АМПА [27]. Таким чином, використання цих інструментів не може забезпечити абсолютну ідентифікацію типу рецептора, активація якого зумовлює цей ефект. Ситуація ускладнюється ще й тим фактом, що каїнатні рецептори швидко десенситизуються. Щоб запобігти цьому широко використовується лектин конканавалін А, який зв'язується з N-глікозилітованими ділянками рецептора та попереджає швидку десенситизацію рецепторів [28]. Дійсно, як показали наші експерименти, присутність 1 мкМ конканаваліну А в середовищі інкубації значно підсилює каїнатіндуковане вивільнення $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ із синапсом (рис. 2, А). Виходячи з того, що конканавалін А впливає на роботу

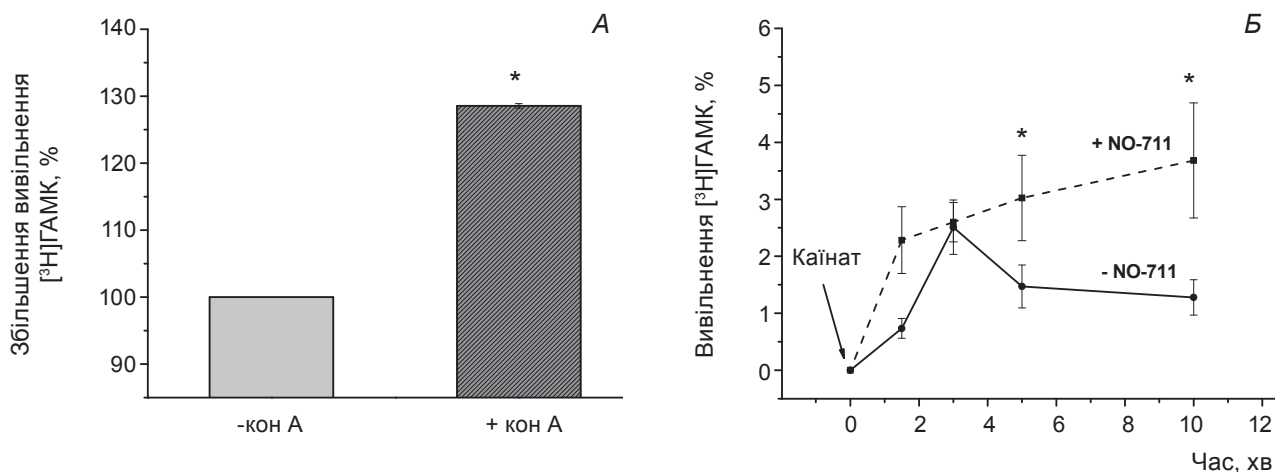


Рис. 2. Вплив калію (2,5 мкМ) на вивільнення $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ (%) із нервових терміналей гіпокампа. А – Каліатіндуковане вивільнення $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ у присутності та за відсутності у середовищі інкубації 1 мкМ конканаваліну А. Вивільнення $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ в середовищі без конканаваліну А прийнято за 100% ($n = 3$), $*P < 0,05$. Б – Кінетика вивільнення $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ під впливом калію в нормі і у присутності 30 мкМ NO-711 ($n = 6$), $*P < 0,05$ порівняно з NO-711

калієвих, а не АМПА-рецепторів [29], можна зробити висновок, що саме калієві рецептори роблять істотний внесок у розвиток цього ефекту.

Кінетика вивільнення $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ із синапсом під час активації калієвих рецепторів схожа на кінетику вивільнення нейромедіатора у разі додавання природного агоніста – глутамату, а саме, спостерігається швидке вивільнення $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ із наступним захопленням мітки в нервові терміналі (рис. 2, Б). Нечутливість першої фази калієвоіндукованого вивільнення нейромедіатора до NO-711 підтверджує наше припущення, що процес відбувається за рахунок екзоцитозу, а не внаслідок зворотної роботи транспортерів.

Тригером екзоцитозу, як відомо, є потенціал дії, який спричинює деполяризацію плазматичної мембрани нервових терміналей і, як наслідок, відкриття потенціалзалежних кальцієвих каналів, тимчасове підвищення внутрішньоклітинної концентрації кальцію та злиття синаптичних везикул із плазматичною мембраною. Логічно припустити, що за відсутності потенціалу дії екзоцитоз, спровокований активацією калієвих рецепторів, може запускатися за таким сценарієм: вхід позитивно заряджених іонів через канали, спряжені з рецепторами, зумовлює локальну деполяризацію мембрани та активацію потенціалзалежних натрієвих каналів. Додатковий вхід натрію через ці канали збільшує деполяризацію мембрани, що активує кальцієві канали. Щоб визначити чи залучені потенціалзалежні натрієві

канали до розвитку досліджуваного нами процесу, досліди проводили у присутності тетродотоксину (ТТХ) – специфічного блокатора натрієвих каналів [30]. Як показали наші експерименти, ТТХ (1 мкМ) не впливає на кінетику калієвоіндукованого вивільнення $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$, що свідчить про те, що активація рецепторів сама по собі є достатньою для індукції вивільнення ГАМК і не потребує додаткової активації потенціалзалежних натрієвих каналів.

Вплив НМДА на вивільнення $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ із синапсом кори мозку щурів. Якщо активація калієвих/АМПА рецепторів, як вважають, спряжена в основному з підвищенням мембранної проникності до одновалентних іонів Na^+ та K^+ , то активація НМДА-рецепторів має наслідком суттєве підвищення кальцієвої провідності. До недавнього часу основну увагу дослідників було сфокусовано на вивчення ролі НМДА-рецепторів в розвитку ексайтотоксичності (патологічного процесу надмірного збудження). Проте останні дані доводять, що активація НМДА-рецепторів може призводити до діаметрально протилежного ефекту – нейропротекції. Показано, що запуск принципово різних сигнальних каскадів і нарешті транскрипції різних генів відбувається залежно від локалізації рецепторів – пресинаптичної або екстрасинаптичної [31]. Пресинаптичні НМДА-рецептори, на відміну від екстрасинаптичних, сприяють захисту та виживанню нейронів. В імуногістохімічних дослідженнях було показано, що рецептори

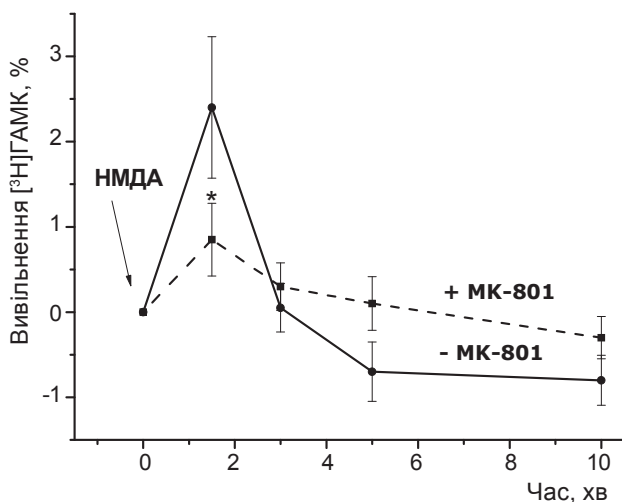


Рис. 3. Вивільнення $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ (%) із нервових терміналей кори мозку щурів за дії 250 мкМ НМДА в нормі і у присутності 30 мкМ МК-801. Експерименти проводились в безмагнієвому середовищі у присутності 100 мкМ гліцину; ($n = 3$), * $P < 0,05$ порівняно з МК-801

НМДА експресуються як на глутаматергічних, так і на ГАМКергічних нервових терміналях. Колокалізація субодиниць рецептора НМДА із синаптофізином та декарбоксилазою глутамінової кислоти (GAD65/67) доводить, що цей рецептор знаходиться безпосередньо на пресинапсі та асоційований із сайтами вивільнення ГАМК [14].

Важливою особливістю НМДА-рецепторів є їхня низька спорідненість до агоніста у стані спокою, оскільки сайт зв'язування глутамату заблокований іоном магнію за потенціалзалежним механізмом. *In vivo* деполяризація мембрани усуває «магнієвий блок», що приводить до відкриття каналу. Інша специфічна риса НМДА-рецепторів полягає в тому, що для активації їх необхідний гліцин як коагоніст глутамату. Виходячи з цього, наступні експерименти із специфічним агоністом НМДА-рецепторів ми проводили в безмагнієвому середовищі у присутності 100 мкМ гліцину.

Попередні дослідження показали, що НМДА стимулював вивільнення $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ із нервових терміналей кори головного мозку щурів і його діюча концентрація знаходилася в діапазоні 250–500 мкМ. На рис. 3 наведено кінетику НМДА-стимульованого вивільнення $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ протягом 10 хв. Як видно, характер вивільнення нейромедіатора подібний до вивільнення $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ за дії глутамату та каїнату і свідчить, що початкове збільшення

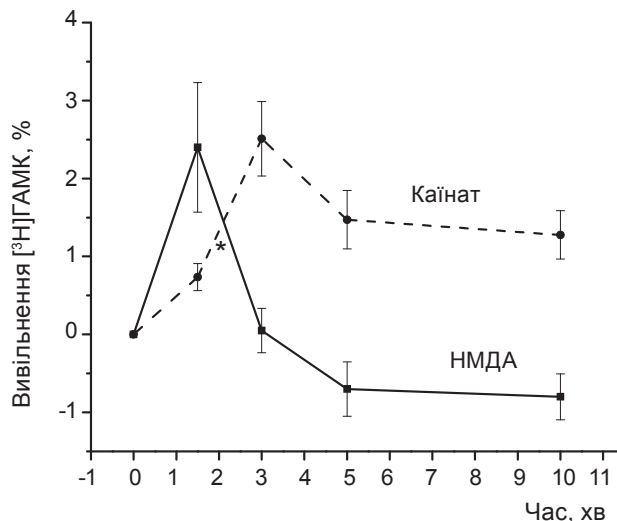


Рис. 4. Порівняння кінетики вивільнення $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ (%) із нервових терміналей кори та гіпокампа головного мозку щурів за дії 250 мкМ НМДА та 2,5 мкМ каїнату

позаклітинної концентрації $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ є результатом стимуляції процесу екзоцитозу, а подальше зменшення — обумовлено активним трансмембранним транспортуванням. Ми також дослідили НМДА-стимульоване вивільнення $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ у присутності МК-801 (специфічного антагоніста НМДА-рецепторів), який блокує його відкритий канал. Такий підхід дає можливість стверджувати, що ефект є специфічним та опосередкований саме активацією рецептора. Як видно з рис. 3, у присутності МК-801 (30 мкМ) спостерігається значне інгібування відповіді на НМДА. Отже, стимуляція вивільнення ГАМК у разі додавання НМДА опосередкована саме активацією рецепторзв'язаного іонного каналу.

Слід відзначити, що активація НМДА-рецепторів порівняно з каїнатними забезпечує більш швидку відповідь: максимальне вивільнення спостерігається вже на 1-ій хвилині, тоді як максимальне вивільнення у разі додавання каїнату спостерігається на 3-ій хвилині після внесення агоніста (рис. 4). Вірогідно, така швидка відповідь на внесення НМДА обумовлена високою провідністю НМДА-рецепторів для іонів кальцію, що можуть безпосередньо стимулювати екзоцитоз в активній зоні, а також спричинювати додаткове Ca^{2+} -індуковане вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо [18, 32]. З'ясування питання щодо того, яким чином забезпечується підвищення концентрації Ca^{2+} до рівня достатнього для реалізації екзоцитозу — за рахунок виключно активації рецепторів чи із залучен-

ням внутрішньоклітинних резервів – потребує подальших досліджень.

Таким чином, показано, що функціонально активні глутаматні НМДА та кайнатного типів локалізовані на нервових терміналях гіпокампа та кори головного мозку і залучені до тонкої регуляції нейросекреторного процесу. Продемонстровано, що модуляція глутаматними рецепторами сили синаптичної відповіді полягає у підвищенні вірогідності вивільнення нейромедіатора із нервових терміналей. На основі дослідів із блокаторм ГАМК-транспортерів ми дійшли висновку щодо залучення везикулярного, а не цитозольного пулу нейротрансмітера до цього процесу.

АКТИВАЦИЯ ПРЕСИНАПТИЧЕСКИХ ИОНОТРОПНЫХ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ СТИМУЛИРУЕТ ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ГАМК ИЗ НЕРВНЫХ ТЕРМИНАЛЕЙ ГИППОКАМПА И КОРЫ МОЗГА КРЫС

*О. А. Крупко, А. С. Тарасенко,
Н. Г. Гиммельрейх*

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: olya_krupko@mail.ru

Одним из механизмов тонкой регуляции нейросекреторного процесса в нервных терминалях является активация пресинаптических рецепторов. Целью исследования было определить, как активация пресинаптических глутаматных рецепторов влияет на секрецию тормозного нейротрансмиттера ГАМК, какие типы ионотропных рецепторов вовлечены в модуляцию этого процесса и по какому механизму реализуется это влияние. Показано, что специфические агонисты кайнатных и НМДА-рецепторов, кайнат и НМДА, также как и глутамат, стимулируют высвобождение [³H]ГАМК из нервных терминалей коры и гиппокампа мозга крыс, что указывает на вовлечение обоих типов рецепторов в модуляцию секреции ГАМК. Установлено, что ответ терминалей на активацию кайнатных и НМДА рецепторов опосредован стимуляцией процесса экзоцитоза, а не высвобождением нейротрансмиттера из цитозольного пула, о чем свидетельствует неспособность NO-711 (специфического блока-тора транспортёров ГАМК), блокировать этот процесс. Таким образом, активация пресинаптических ионотропных глутаматных рецепто-

ров модулирует силу синаптического ответа за счет изменения вероятности высвобождения медиатора из нервных терминалей.

Ключевые слова: пресинаптические ионотропные глутаматные рецепторы, высвобождение ГАМК, нервных терминалей, экзоцитоз.

ACTIVATION OF PRESYNAPTIC IONOTROPIC GLUTAMATE RECEPTORS STIMULATES GABA RELEASE FROM HIPPOCAMPAL AND CORTICAL RAT BRAIN NERVE TERMINALS

*O. O. Krupko, A. S. Tarasenko,
N. G. Himmelreich*

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: olya_krupko@mail.ru

S u m m a r y

One of the pathways implicated in a fine-tuning control of neurosecretory process is the activation of presynaptic receptors. The present study was focused on the role of presynaptic glutamate receptor activation in the regulation of inhibitory synaptic transmission in the rat hippocampus and cortex. We aimed to clarify what types of ionotropic glutamate receptors are involved in the modulation of GABA secretion, and what mechanism underlies this modulation. We have revealed that specific agonists of kainate and NMDA receptors, kainate and NMDA, like glutamate, induced the release of [³H]GABA from hippocampal and cortical nerve terminals suggesting the involvement of both types in the regulation of GABAergic transmission. Our results indicate preferential involvement of vesicular, but not cytosolic, pool in response to glutamate receptor activation. This is based on the finding that NO-711 (a specific inhibitor of plasma membrane GABA transporters), fails to attenuate [³H]GABA release. We have concluded that presynaptic glutamate receptor-induced modulation of the strength of synaptic response is due to increasing the release probability of synaptic vesicles.

Key words: presynaptic ionotropic receptors, GABA release, nerve terminals, exocytosis.

1. *Engelman H. S., MacDermott A. B.* // Nat. Rev. Neurosci. – 2004. – 5. – P. 135–145.
2. *Vizi E. S.* // Pharmacol. Rev. – 2000. – 52. – P. 64–89.
3. *Pinheiro P., Mulle C.* // Nat. Rev. Neurosci. – 2008. – 9. – P. 423–436.

4. *Pinheiro P. S., Rodriguez R. J., Rebola N. et al.* // *Neurochem. Int.* – 2005. – **47**. – P. 309–316.
5. *Cunha R. A., Ribeiro J. A., Malva J. O.* // *Neurochem. Int.* – 2004. – **44**. – P. 371–379.
6. *Cossart R., Tyzio R., Dinocourt C. et al.* // *Neuron.* – 2001. – **29**. – P. 497–508.
7. *Rodriguez-Moreno A., Sihra T.* // *J. physiol.* – 2004. – **557**, N 3. – P. 733–745.
8. *Jin X.-T., Smith A.* // *Neuroscience.* – 2007. – **149**. – P. 338–349.
9. *Braga M. F. M., Aroniadou-Anderjaska V., Xie J., Li H.* // *J. Neurosci.* – 2003. – **23**. – P. 442–452.
10. *Lerma J.* // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2006. – **6**. – P. 89–97.
11. *Glitsch M.* // *J. Neurophysiol.* – 2006. – **96**. – P. 86–96.
12. *Duguid I., Trevor S.* // *Nat. Neurosci.* – 2004. – **7**. – P. 525–533.
13. *Corlew R., Brasier D. J., Feldman D. E., Philpot B. D.* // *Neuroscientist.* – 2008. – **14**. – P. 609–625.
14. *Kullmann D. M.* // *Neuron.* – 2001. – **32**. – P. 561–564.
15. *Fiszman M., Erdelyi F., Szabo G., Vicini S.* // *Neuropharmacology.* – 2007. – **52**. – P. 1631–1640.
16. *Min M.-Y., Melyan Z., Kullmann D. M.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – **96**. – P. 9932–9937.
17. *Mathew S., Hablitz J.* // *Neuropharmacology.* – 2008. – **55**. – P. 106–116.
18. *Glitsch M.* // *Neurosci.* – 2008. – **151**. – P. 403–409.
19. *Lauri S. F., Bortolott Z. A., Nistico R. et al.* // *Neuron.* – 2003. – **39**. – P. 327–341.
20. *Calaz K. C., Gardino P. F., de Mello F. G.* // *Neurochem. Int.* – 2006. – **29**. – P. 769–777.
21. *Bonanno G., Pittaluga A., Fedele E. et al.* // *J. Neurochem.* – 1993. – **61**. – P. 222–230.
22. *Breukel A. I. M., Besselsen E., da Silva F. H. L., Ghijsen W. E. J. M.* // *Eur. J. Neurosci.* – 1998. – **10**. – P. 106–114.
23. *Cotman C. W.* // *Methods in Enzymology.* – 1974. – **31**. – P. 445–452.
24. *Tarasenko A. S., Linetska M. V., Storchak L. G., Himmelreich N. H.* // *J. Neurochem.* – 2006. – **99**. – P. 787–796.
25. *Larson E., Howlett B., Jagendorf A.* // *Anal. Biochem.* – 1986. – **155**. – P. 243–248.
26. *Storchak L. G., Pozdnyakova N. G., Himmelreich N. H.* // *Neuroscience.* – 1998. – **85**. – P. 989–997.
27. *Wilding T. J., Huettner J. E.* // *Mol. Pharmacol.* – 1996. – **49**. – P. 540–546.
28. *Everts I., Villmann C., Hollmann M.* // *Mol. Pharmacol.* – 1997. – **52**. – P. 861–873.
29. *Partin K. M., Patneau D. K., Winters C. A. et al.* // *Neuron.* – 1993. – **11**. – P. 1069–1082.
30. *Hille B.* // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 1970. – **21**. – P. 132–137.
31. *Hardingham G. E., Bading H.* // *Neuroscience.* – 2010. – **11**. – P. 682–696.
32. *Rusakov D. A.* // *Neuroscientist.* – 2006. – **12**. – P. 317–326.

Отримано 17.02.2011