

АУТО- И ГЕТЕРОРЕЦЕПТОРНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ НЕЙРОПЕРЕДАТЧИКА ИЗ ГЛУТАМАТ/ АСПАРТАТЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ КОРЫ МОЗГА КРЫС

ПРИХОЖАН А. В., КОВАЛЕВ Г. П., РАЕВСКИЙ К. С.

Институт фармакологии АМН СССР, Москва

В опытах с регистрацией K^+ (30 мМ)-стимулируемого высвобождения 3Н-D-аспарагиновой кислоты из перфузируемых синапсом коры мозга крыс показано, что метиласпаргат (10^{-4} – 10^{-2} М) не изменяет параметров изучаемого процесса, а клиноватая (10^{-4} и 10^{-3} М) и квинкваловая (10^{-3} М) кислоты снижают его, причем эффект последней антагонизируется диэтиловым эфиром глутаминовой кислоты (ДЭЭГ) (10^{-4} М). Феназепам (10^{-4} М) также снижал высвобождение D-аспарагиновой кислоты, его эффект устранялся в присутствии Ro 15-1788 (10^{-4} М), но не ДЭЭГ, и усиливался мусцимолом (10^{-4} М), но не баклофеном (10^{-5} М). Потенцирующее действие мусцимола было биккуллин- и пикротокенинчувствительным. В использованных концентрациях антагонисты, мусцимол и баклофен сами по себе не оказывали заметного влияния на изучаемый процесс. На основании полученных данных постулируется возможность существования ауто- и гетерорецепторной регуляции процесса высвобождения возбуждающих аминокислотных нейротрансмиттеров.

Пресинаптические рецепторы в последнее время привлекают к себе внимание в качестве возможных регуляторов процесса высвобождения нейротрансмиттеров. Принято деление этих рецепторов на ауто- и гетерорецепторы. К первым относят рецепторы, которые локализованы на первичных окончаниях и обладают чувствительностью к выделяемому этим окончанием нейротрансмиттеру. Соответственно термином «гетерорецепторы» обозначают образования той же локализации, но чувствительные к нейротрансмиттеру, который высвобождается терминалями других нейронов [1]. В последние годы начато изучение рецепторной регуляции высвобождения нейротрансмиттеров из глутамат- и аспартатергических нейронов, широко представленных в мозгу млекопитающих, где они составляют основную массу возбуждающих нервных клеток [2]. Гетерогенность рецепторов возбуждающих аминокислотных нейротрансмиттеров можно считать в настоящее время доказанной. Наиболее обоснованным представляется выделение трех типов рецепторов возбуждающих аминокислот: 1) чувствительных к

квискваловой кислоте, антагонист—диэтиловый эфир глутаминовой кислоты (ДЭЭГ); 2) чувствительных к N-метил-аспарагиновой кислоте, антагонисты—аминоадипиновая кислота, фосфоновые кислоты и др.; 3) чувствительных к каннтовой кислоте, для которых пока не обнаружено специфического антагониста [2]. Эндогенные передатчики—глутаминовая и аспарагиновая кислоты связываются со всеми тремя типами рецепторов, поэтому широкое распространение получил термин «глутамат/аспаратные рецепторы». По аналогии стал применяться термин «глутамат/аспаратергические нейроны», так как современные методические подходы, как правило, не позволяют дифференцировать эти две медиаторные системы.

Имеются отдельные сообщения об изучении глутамат/аспаратных ауторецепторов в различных структурах мозга [3—5]. Эти работы, выполненные на срезах мозга, не доказывают пресинаптической (связанной с нервными окончаниями) локализации выявленных рецепторов. Из гетерорецепторов, модулирующих высвобождение возбуждающих аминокислот, наиболее подробно изучены рецепторы типа ГАМК_A в мозжечке [6, 7]. Что касается коры мозга, то одни авторы обнаруживают опосредуемую ГАМК регуляцию высвобождения глутаминовой кислоты [8], другие сообщают о ее отсутствии [9].

В свете этих данных целью настоящей работы явилось изучение механизмов регуляции процесса K^+ -стимулируемого высвобождения нейротрансмиттера из глутамат/аспаратергических нейронов, в частности, возможного участия в этих процессах глутаматных (аспаратных) ауторецепторов, ГАМК_A, ГАМК_B и безводназепиновых рецепторов. Для анализа использовали типичные агонисты указанных рецепторов. В качестве «маркера» процесса высвобождения использовали ³H-D-аспарагиновую кислоту—неметаболизирующийся субстрат системы захвата L-форм глутаминовой и аспарагиновой кислот [10].

Материалы и методы

Опыты проводили на крысах-самцах линии *Wistar* массой 180—220 г. Фракцию неочищенных синапсом (P₂) коры мозга выделяли по методике, подробно описанной ранее [11]. Использовали оксигенированный Krebs-бикарбонатный буфер следующего состава (в mM): NaCl—118; KCl—4,75; CaCl₂—2,54; MgSO₄—2,2; NaHCO₃—25,0; KH₂PO₄—1,19; глюкоза—11,0; pH 7,4. Для получения буфера с повышенным содержанием K^+ (30 mM) NaCl замещали на соответствующее количество KCl. 50 мкл суспензии синапсом (концентрация белка 7—9 мг/мл) инкубировали в 1 мл буфера при 37°. Через 5 мин добавляли 2,3-³H-D-аспарагиновую кислоту («Изотоп», СССР; величина У.Л. 33 Ки/ммоль) до конечной концентрации 10⁻⁷ M. Инкубацию продолжали 10 мин при легком встряхивании, после чего взвесь синапсом наносили на стеклянно-волоконистый фильтр GF/C «Whatman» (диаметр 20 мм), закрепленный в термостатируемой камере. Среду инкубации удаляли при скорости 4 мл/мин при помощи перистальтического насоса «ЛКВ Мультитрекс» (Швеция), затем синапсомы промывали дважды 2 мл буфера. Дальнейшую перфузию проводили при скорости 1 мл/мин. Через 6 мин перфузии исходным буфером в камеру вносили буфер с повышенным содержанием калия (30 mM) с используемым веществом или без него (контроль). Количественную оценку высвобождения прово-

дили, измеряя радиоактивность следующих фракций суперфузата: фракция I—последние 2 мин перфузии исходным буфером, фракция II и фракция III—соответственно 2 первые и 2 последующие мин после внесения буфера с повышенным содержанием калия (с веществом или без него). Фракции растворяли в сцинтилляционной жидкости Брея, величины радиоактивности в дпм определяли на жидкостно-сцинтилляционном счетчике «Intertechnique SL-4000». Далее для каждой суперфузии находили отношение радиоактивностей фракции II к фракции I (А) и фракции III к фракции I (Б). Данные обрабатывали с использованьем t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Результаты экспериментов по изучению влияния агонистов глутамат/аспартатных рецепторов на K^+ -стимулируемое высвобождение 3H -D-аспарагиновой кислоты представлены в табл. 1. В диапазоне исследованных концентраций N-метиласпартат не изменял высвобождения метки из синапсом, канновая (10^{-4} и 10^{-3} М) и квискваловая (10^{-3} М) кислоты снижали выход D-аспарагиновой кислоты, причем

Таблица 1

Влияние агонистов глутамат/аспартатных рецепторов и диэтилового эфира глутаминовой кислоты на K^+ -стимулируемое высвобождение 3H -D-аспарагиновой кислоты из синапсом коры мозга крыс

Соединения, (М)	Количество опытов n	Высвобождение 3H -D-аспарагиновой кислоты (% от контроля*)	
		A	B
Контроль	50	100,0±2,5	100,0±2,8
N-метил-DL-аспарагиновая кислота			
10^{-6}	4	98,6±5,6	99,6±6,2
10^{-5}	4	96,8±3,6	93,6±3,0
10^{-4}	5	102,6±3,5	93,6±4,0
10^{-3}	7	95,1±2,9	100,4±3,7
Канновая кислота			
10^{-7}	5	96,8±5,8	89,1±9,0
10^{-6}	10	95,8±4,3	100,1±4,5
10^{-5}	10	95,7±3,3	96,9±3,1
10^{-4}	8	73,6±6,4**	82,4±8,3
10^{-3}	6	58,2±2,9**	65,2±5,2**
Квискваловая кислота			
10^{-6}	4	104,9±3,6	104,1±7,5
10^{-5}	4	100,2±9,8	101,1±8,9
10^{-4}	6	96,3±3,1	105,6±3,1
10^{-3}	7	85,3±1,7**	98,1±2,2
Диэтиловый эфир глутаминовой кислоты			
10^{-4}	8	101,4±2,8	99,6±3,0
Квискваловая кислота 10^{-3} +диэтиловый эфир глутаминовой кислоты			
10^{-4}	6	100,0±2,2***	113,5±3,8***

Примечание. * За 100% принято: для А—1,735±0,043, для В—1,335±0,038. ** — достоверность отличий от контроля ($p < 0,01$), *** — достоверность отличий от эффекта 1 мМ квискваловой кислоты ($p < 0,01$).

эффект квискваловой кислоты устраняли добавлением ДЭЭГ (10^{-4} М). В табл. 2 приведены результаты опытов с агонистами и антагонистами ГАМК- и бензодиазепиновых рецепторов. Эти опыты позволили, в

частности, выявить максимальные концентрации антагонистов, не оказывающие самостоятельного влияния на изучаемый процесс. Эти концентрации веществ использовали в дальнейших опытах. Как видно из приведенных данных, мусцимол и баклофен не оказывали прямого влияния на K^+ -стимулируемое высвобождение D-аспарагиновой кислоты. Из данных, представленных в табл. 3, следует, что феназепам (10^{-1} M) снижает высвобождение; эффект частично устраняется Ro 15-1788 (10^{-1} M), но не изменяется в присутствии ДЭЭГ (10^{-1} M). Интересно, что мусцимол (10^{-1} M) заметно усиливает действие феназепама, причем этот эффект усиления оказался чувстви-

Таблица 2

Влияние агонистов и антагонистов ГАМК_A- и бензодиазепиновых рецепторов на K^+ -стимулируемое высвобождение 3H-D-аспарагиновой кислоты из синапсом коры мозга крысы

Соединения, (M)	Количество опытов	Высвобождение ³ H-D-аспарагиновой кислоты (% от контроля)	
		A ¹	B
Контроль	50	100,0±2,5	100,0±2,8
Мусцимол			
10 ⁻⁵	6	99,7±4,6	107,1±3,5
10 ⁻⁴	6	93,4±3,1	92,1±4,8
Бикикуллин			
10 ⁻⁵	6	93,4±3,6	91,4±3,0
10 ⁻⁴	7	88,2±4,6	89,5±6,9
Пикротоксин			
10 ⁻⁵	5	104,0±4,4	102,9±4,2
10 ⁻⁴	8	99,6±4,7	102,1±5,4
5·10 ⁻⁴	4	105,4±9,6	116,0±10,1
Ro 15-1788			
10 ⁻⁶	5	104,7±6,0	98,2±3,5
10 ⁻⁴	5	97,4±4,4	97,4±5,9
Баклофен			
10 ⁻⁵	7	108,6±4,4	100,0±4,2
1 ⁻⁴	8	103,3±6,7	97,4±6,8

Примечание. A¹ и B—то же, что в табл. 1. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

тельным как к бикикуллину (10^{-5} M), так и к пикротоксину (10^{-4} M). Оба антагониста уменьшали эффект мусцимола приблизительно наполовину. Агонист ГАМК_B-рецепторов баклофен (10^{-5} M) на эффект феназепама заметного влияния не оказывал.

Полученные данные свидетельствуют о наличии ауторегуляторного механизма, контролирующего процесс высвобождения возбуждающих аминокислотных нейротрансмиттеров в коре головного мозга, что согласуется с данными, полученными Collins и соавт. [5] на срезах коры. В отличие от результатов цитируемой работы, где ауторецептор проявлял чувствительность к метиласпартату, в наших экспериментах не выявлено какого-либо эффекта этого вещества. Эти различия могут быть связаны с тем, что в опытах на срезах высвобождение нейротрансмиттера может модулироваться не только синаптическими, но и висинаптическими рецепторами. Collins и соавт. исследовали влияние квескваловой кислоты до концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ M и не об-

наружили эффекта [5]. Нами также не обнаружено действия этого вещества до концентрации 10^{-4} М. Лишь при концентрации последнего 10^{-3} М высвобождение D-аспарагиновой кислоты оказалось достоверно сниженным, причем эффект полностью устранялся ДЭЭГ, что свидетельствует о его рецепторной природе.

Имеются косвенные данные о наличии квисквалатных ауторецепторов и в других структурах мозга. Так, сообщается, что антагонист квисквалатных рецепторов ДЭЭГ способен устранять ингибирующее влияние L-глутаминовой кислоты на высвобождение ^3H -D-аспарагиновой кислоты из срезов гиппокампа [3].

Таблица 3

Действие агонистов ГАМК_A*, ГАМК_B-рецепторов и антагонистов ГАМК_A-, бензодиазепиновых и квисквалатных рецепторов на эффект феназема при К⁺-стимулируемом высвобождении ^3H -D-аспарагиновой кислоты из синантосом коры мозга крысы

Соединения, (М)	Количество опытов	Высвобождение ^3H -D-аспарагиновой кислоты (% от контроля)		
		A ¹	I	B ¹
Контроль	50	100,0±2,5		100,0±2,5
Феназем				
10^{-5}	5	106,1±2,3		104,9±3,0
10^{-1}	9	87,6±3,7*		87,6±3,3*
Феназем, 10^{-1}				
+Ro 15-1788, 10^{-1}	8	78,7±3,5		100,0±7,0**
Феназем, 10^{-1}				
баклофен, 10^{-5}	7	81,9±2,7		87,3±5,0
Феназем, 10^{-1}				
+мусцим л, 10^{-1}	9	74,2±1,2**		91,8±2,9
Феназем, 10^{-1}				
+мусцимол, 10^{-1}				
-биккукулин, 10^{-5}	12	80,1±2,7		86,9±3,2
Феназем, 10^{-1}				
+мусцимол, 10^{-1}				
-пикротоксин, 10^{-1}	7	82,7±2,1		88,3±3,2
Феназем, 10^{-1}				
+диэтиловый эфир глутаминовой кислоты, 10^{-1}	12	84,1±1,8		90,3±3,3

Примечание. A¹ и B¹ то же, что в табл. 1; * $p < 0,05$ по сравнению с контролем; **—достоверное отличие от эффекта феназема (0,1 мМ) при $p < 0,01$.

Каншювая кислота, по данным большинства исследований, усиливала как спонтанное, так и стимулированное высвобождение D-аспарагиновой кислоты, а также эндогенных возбуждающих аминокислот [4, 5, 12, 13]. Этим отчасти объясняют нейротоксические свойства каншювой кислоты [2]. Однако отсутствие специфического антагониста каншюватных рецепторов не позволяет пока обосновать рецепторную природу полученного эффекта. С другой стороны, являясь агонистом одного из типов глутамат/аспаратных рецепторов, каншювая кислота, воздействуя на ауторецепторы, должна была бы, согласно принятым представлениям, тормозить высвобождение нейротрансмиттера. Наши данные подтверждают эту гипотезу. Каншювая кислота, так же как и другой агонист—квискваловая кислота, значительно снижала высвобождение D-аспарагиновой кислоты из синантосом, что согласуется с

общепринятой точкой зрения, согласно которой ауторецептор функционирует на нервном окончании по принципу отрицательной обратной связи. Трудность интерпретации результатов работ, цитированных выше, состоит, в частности, в том, что при использовании срезов нельзя исключить как внесинаптические эффекты каннтовой кислоты, так и прямое деполяризующее действие на глиальные клетки [14].

Типичный агонист ГАМК_A-рецепторов мусцимол в наших опытах не изменял К⁺-стимулируемое высвобождение D-аспарагиновой кислоты, что согласуется с данными, полученными на синапсоммах ранее [9]. Вместе с тем, в работе, выполненной на срезах коры мозга, эффект мусцимола отмечался, причем была показана его пикротоксичность [3]. Бензодиазепиновый транквилизатор феназепам, по нашим данным, уменьшал выход D-аспарагиновой кислоты, а антагонист бензодиазепиновых рецепторов Ro 15-1788 частично устранял этот эффект, что свидетельствует в пользу рецепторной природы обнаруженного явления. Имеются многочисленные данные, указывающие на функциональную связь бензодиазепиновых рецепторов с ГАМК_A-, но не с ГАМК_B-рецепторами [15]. Полученные нами данные по влиянию агонистов ГАМК_A- и ГАМК_B-рецепторов (соответственно мусцимола и баклофена) на эффект феназепама, зависимость действия мусцимола от биккуллина и пикротоксина вполне согласуются с этими представлениями и дают основание предположить существование ГАМК_A-бензодиазепинового рецепторного комплекса на глутамат/аспартатергических пресинаптических терминалях коры мозга. Функциональная роль такого комплекса состоит, по всей вероятности, в модулировании высвобождения возбуждающих аминокислотных нейротрансмиттеров. Отметим, что в мозжечке ГАМК-ергическая регуляция высвобождения D-аспарагиновой кислоты осуществляется через ГАМК_A-рецепторы, несвязанные с бензодиазепиновыми участками [16], а уменьшение высвобождения АХ из срезов коры мозга при активации ГАМК_A-рецепторов даже обращается диазепамом [17]. Отсюда следует, что постсинаптический ГАМК_A-рецептор, являясь пресинаптическим гетерорецептором, может быть по-разному сопряжен с бензодиазепиновыми рецепторами в разных структурах мозга. Однонаправленность действия ауто- и гетеро (ГАМК)-рецепторов на высвобождение D-аспарагиновой кислоты, выявленная в наших опытах, позволяла предположить наличие их функциональной взаимосвязи, однако отсутствие эффекта ДЭЭГ на действие феназепама не подтвердило этого предположения.

Таким образом, результаты настоящей работы позволяют постулировать наличие квисквалатного и, возможно, каннтового ауторецептора, а также ГАМК_A-бензодиазепинового рецепторного комплекса, функционирующих на терминалях глутамат/аспартатергических нейронов в качестве механизмов, модулирующих высвобождение возбуждающих аминокислотных нейротрансмиттеров.

REGULATION OF NEUROTRANSMITTER RELEASE FROM GLUTAMATE/ASPARTATE NEURONS OF RAT BRAIN CORTEX BY AUTO AND HETERORECEPTORS

PRIKHOZHAN A. V., KOVALEV G. I., RAYEVSKY K. S.

Institute of Pharmacology, USSR Academy of Medical Sciences,
Moscow

Both kainic (10^{-7} and 10^{-8}) and quisqualic (10^{-8} M) acids, but not N-methylaspartate (10^{-6} — 10^{-8} M) decreased K^{+} (30 mM)—stimulated release of 3H -D-aspartate from perfused rat cortex synaptosomes. GIDEE (10^{-1} M) antagonized the effect of quisqualic acid. Benzodiazepine, phenazepam (10^{-1} M) also attenuated the release, and this effect was blocked by RO 15—1788 (but not by GIDEE), and potentiated by muscimol (10^{-1} M). This latter effect was shown to be bicuculline- and picrotoxin-sensitive. The antagonists as well as muscimol and baclofen in the concentrations used exert no effect on D-aspartate release. Data are discussed in the terms of auto- and heteroregulation of the release of excitatory amino acid neurotransmitters.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Laduron P. M. *Biochem. Pharmacol.*, v. 34, p. 467—470, 1985.
2. Fonnum F. J. *Neurochem.*, v. 42, p. 1—11, 1984.
3. McBean G. J., Roberts P. J. *Nature*, v. 291, p. 593—594, 1981.
4. Ferkany J. W., Zaczek R., Coyle J. T. *Nature*, v. 298, p. 757—759, 1982.
5. Collins G. G. S., Anson J., Surtees L. *Brain Res.*, v. 265, p. 157—159, 1983.
6. Aloisi F., Gallo V., Levi G. J. *Neurosci. Res.*, v. 10, p. 141—149, 1983.
7. Schousboe A., Drejer J., Meier E. *Neuropharmacology*, v. 68, p. 369—372, 1984.
8. Collins G. G. S. *Brain Res.*, v. 190, p. 517—527, 1980.
9. Levi G., Gallo V., Rutteri M. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, v. 27, p. 127—137, 1981.
10. Davies L. P., Johnston G. A. R. *J. Neurochem.*, v. 26, p. 1007—1014, 1976.
11. Ковалев Г. И., Прихожан А. В., Раевский К. С. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, № 11, с. 59—61, 1982.
12. Ferkany J. W., Coyle J. T. *J. Pharmacol. and Exp. Ther.*, v. 225, p. 399—406, 1983.
13. Ferkany J. W., Zaczek R., Coyle J. T. *Nature*, v. 308, p. 561, 1984.
14. Bowman C. L., Kimelberg H. K. *Nature*, v. 311, p. 656—659, 1984.
15. Haefely W. *Neurosci. Lett.*, v. 47, p. 201—206, 1984.
16. Rohde B. H., Harris R. A. *Neuropharmacology*, v. 22, p. 721—727, 1983.
17. Tanganelli S., Bianchi C., Beani L. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 324, p. 34—37, 1983.

Поступила 17. V 1986