

## РОЛЬ МЕТАБОТРОПНЫХ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ II И III ГРУПП В МОДУЛЯЦИИ МИНИАТЮРНОЙ СИНАПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МОТОНЕЙРОНОВ СПИННОГО МОЗГА ЛЯГУШКИ

© О. А. Карамян, В. М. Кожанов, И. С. Масалов, Н. М. Чмыхова,<sup>1</sup> Н. П. Веселкин

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург;  
<sup>1</sup> электронный адрес: nchmykhova@mail.ru

Результаты работы демонстрируют выраженные модулирующие влияния, опосредуемые мГлуР II и III групп, на миниатюрную синаптическую активность мотонейронов спинного мозга лягушки. Характер влияний лигандов мГлуР II и III групп — изменения частоты мПСП и отсутствие значимых изменений их амплитуды — свидетельствуют о пресинаптическом механизме модуляции за счет изменения процесса выделения медиаторов. Апликация селективных антагонистов мГлуР II и III групп EGLU и MAP4 приводила к увеличению частоты мПСП в среднем на  $52.8 \pm 30.2$  (в 4 из 6 исследуемых мотонейронов) и на  $54.7 \pm 23.7$  % (в 7 из 7 исследуемых мотонейронов) соответственно. Апликация агониста мГлуР III группы L-AP4 снижала частоту мПСП на  $21.8 \pm 5.2$  % в 3 из 5 мотонейронов. Эффективность использования антагонистов мГлуР и сравнительно низкая эффективность агониста позволяют предположить, что пресинаптические мГлуР тонически активны. Отсутствие эффекта антагониста мГлуР II группы EGLU в некоторых мотонейронах, по-видимому, связано с особенностью локализации этого типа мГлуР в удаленной от места выделения медиатора претерминальной области. Исследована гетерорецепторная модуляция фармакологически изолированной тормозной миниатюрной активности и ее глицин- и ГАМКергической фракций, опосредованная мГлуР III группы. Показано, что апликация MAP4 в значительно большей степени повышает частоту глициноопосредованных мПСП, чем ГАМК-опосредованных мПСП: в среднем на  $97.6 \pm 20.7$  ( $n = 7$ ) и  $54.6 \pm 20.8$  % ( $n = 5$ ) соответственно. Возможно, различная эффективность модуляции глицин- и ГАМК-опосредованных мПСП связана с сегрегацией постсинаптических глициновых и ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов. Исследование конвергенции модулирующих влияний пресинаптических мГлуР и метаботропных ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов показало, что в условиях блокады тонически активных ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов факлофеном агонист мГлуР III группы L-AP4 вызывает типичный эффект, который полностью снимается последующей апликацией антагониста MAP4. Этот результат соответствует представлению о независимости влияний, опосредуемых ГАМК<sub>B</sub>-рецепторами и мГлуР III группы.

Ключевые слова: нейромодуляция, лягушка, спинальные мотонейроны, миниатюрные постсинаптические потенциалы, метаботропные глутаматные рецепторы.

Принятые сокращения: ГАМК — гамма-аминомасляная кислота, мГлуР — метаботропные глутаматные рецепторы, мПСП — миниатюрные постсинаптические потенциалы, мТПСП — миниатюрные тормозные постсинаптические потенциалы, CNQX — 6-циано-7-нитроквиноксалин-2-3-дион, D-AP5 — D(-)-2-амино-5-фосфонопентаноидная кислота, EGLU — (2S)- $\alpha$ -этилглутаминовая кислота, L-AP4 — (L)-2-амино-4-фосфомаляная кислота, MAP4 — (S)-2-амино-2-метил-4-фосфомаляная кислота.

Сходство в организации синаптических входов и рецепторного обеспечения мотонейронов спинного мозга лягушки и млекопитающих (Curtis, Johnson, 1974; Krnjevic, 1974; Kudo, 1978; Shapovalov, 1980), а также допущение, что их мГлуР гомологичны (Hackman et al., 1997), позволяют рассматривать спинной мозг лягушки в качестве адекватного объекта для исследования процессов модуляции синаптической передачи, осуществляемых посредством мГлуР. Работы, выполненные на лягушке (Gotani et al., 1995; Holohean et al., 1999; Мельян, Кожанов, 1997; Hackman et al., 1997; Holohean et al., 1999), посвящены исследованию эффектов активации или блокады мГлуР на вызванные постсинаптические потенциалы и посттетанические процессы.

В различных структурах ЦНС мГлуР II и III групп имеют преимущественно пресинаптическую локализацию (Shigemoto et al., 1997; Corti et al., 2002) и вовлечены в пресинаптическую модуляцию возбуждающей и тормозной синаптических передач (Cartmell, Schoepp, 2000), в частности в спинном мозге (Pook et al., 1992; Ishida et al., 1993; Cao et al., 1995; Gerber et al., 2000; Кожанов и др., 2001, 2004). Морфологическими методами исследовано представительство мГлуР II и III групп в дорсальных рогах спинного мозга крысы (Li et al., 1997; Valerio et al., 1997; Tang, Sim, 1999; Carlton et al., 2001) и в значительно меньшей степени в вентральных рогах: мГлуР II группы выявлены на аксонах и аксонных терминалях (Tang, Sim, 1999) и на мелких клетках, окружающих мо-

тонеяроны (Berthele et al., 1999); мГлуР III группы — на мотонейронах латерального моторного ядра (Berthele et al., 1999). Данные о локализации мГлуР в спинном мозге амфибий отсутствуют.

Широко используемым подходом для исследования модуляции синаптической передачи является анализ спонтанной и миниатюрной спонтанной активности мотонейронов. Характеристики спонтанных миниатюрных потенциалов мотонейронов лягушки детально исследованы (Katz, Miledi, 1963, 1967; Colomo, Erulkar, 1968; Курчавый, 1984; Полина и др., 2006), а применение фармакологической изоляции глутамат-, ГАМК- и глицинергической фракций постсинаптических потенциалов и селективных антагонистов и агонистов мГлуР II и III групп позволяет оценить характер и степень модуляции различных компонентов синаптической активности, осуществляемой этими группами мГлуР.

Особый интерес представляет исследование влияния мГлуР на тормозную фракцию миниатюрной спонтанной активности и ее компоненты, так как тормозные медиаторы ГАМК и глицин в ряде синапсов локализованы в пресинаптических окончаниях на нейронах спинного и продолговатого мозга позвоночных, что показано с использованием иммуногистохимических (Bohlhalter et al., 1994; Todd et al., 1996; Vesselkin et al., 2000), электрофизиологических и нейрофармакологических методов (Jonas et al., 1998; Chery, Koninck, 1999; O'Brien, Berger, 1999; Wu et al., 2002; Katsurabayashi et al., 2004; Полина и др., 2006).

В настоящей работе оценивали участие мГлуР II и III групп в модуляции эффективности синаптической передачи по изменениям частоты и амплитуды спонтанных мПСП разной эргичности в мотонейронах спинного мозга лягушки *Rana ridibunda* после блокирования или активации мГлуР этих групп. Параллельный анализ частоты и амплитуды мПСП позволяет оценить эффективность и определить локализацию активности мГлуР.

## Материалы и методика

Эксперименты проводили на препаратах изолированного мозга лягушки *R. ridibunda*. У лягушки, предварительно наркогизированной эфиром, вырезали поясничный отдел позвоночника, включающий в себя спинной мозг. В ванночке с охлажденным (до 4–6 °С) раствором Рингера после ламинэктомии высвобождали корешки 8–10-го поясничных сегментов и переносили мозг в экспериментальную камеру. Поперечными разрезами выделяли соответственно сегментам срезы толщиной 2–3 мм и использовали их последовательно. С помощью тонких иголок тестируемый срез фиксировали в камере роstralной поверхности вверх. Нормальный суперфузирующий раствор имел следующий состав (в ммоль/л): NaCl — 98, KCl — 2, NaHCO<sub>3</sub> — 9.3, MgCl<sub>2</sub> — 0.5, глюкоза — 5, CaCl<sub>2</sub> — 1.1, Трис (рН 7.4–7.6). Температуру раствора в камере постепенно доводили до 15–18 °С и поддерживали с помощью охлаждающего столика. Раствор постоянно аэрировали карбогеном (смесью O<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub> — 98 и 2 % соответственно). Внутриклеточное отведение от мотонейронов производили с помощью микроэлектродов, заполненных 3 М раствором KCl, с диаметром кончика 1.0–1.5 мкм и сопротивлением 10–20 МОм. Мотонейроны идентифи-

цировали по антидромным потенциалам действия, вызываемым раздражением (через всасывающий электрод) вентрального корешка одиночными стимулами (0.1 мс, 10–15 мкА). Уровень мембранного потенциала измеряли цифровым вольтметром.

Исследуемые мотонейроны имели антидромный потенциал действия от 70 до 100 мВ и мембранный потенциал от –60 до –80 мВ. Потенциалы регистрировали через аналогово-цифровой преобразователь на персональный компьютер с выхода микроэлектродного усилителя с автоматической стабилизацией нулевой линии, разработанного в лаборатории. Записывали пробеги длительностью 50 мс с частотой 1 с<sup>-1</sup> при регистрации антидромного потенциала действия и длительностью 250 мс с частотой 0.4 с<sup>-1</sup> при регистрации синаптических потенциалов. Для анализа параметров потенциалов регистрировали выборки из 10–20 пробегов для антидромных потенциалов действия и 400–600 пробегов для синаптических реакций. Анализ параметров потенциалов проводили с помощью компьютерных программ пакета POTENTL и программы Clampfit 8.2 пакета Pclamp 8.2 Axon instruments. Компьютерный анализ мПСП осуществляли с помощью программы Pick6, являющейся модифицированной программой (Ankri et al., 1994), дополненной блоком селекции потенциалов по заданным амплитудным и временным характеристикам.

Статистический анализ и графические построения выполняли с помощью пакета программ SigmaPlot 2.0 и Microsoft Excel. Миниатюрную синаптическую активность мотонейронов (мПСП), обусловленную спонтанным выделением медиаторов, регистрировали в условиях блока проведения импульсов по пресинаптическим волокнам в результате добавления в суперфузирующий раствор 1.0 мкМ тетродотоксина. Для анализа тормозной фракции мПСП в раствор добавляли препараты D-AP5 (50 мкМ) — блокатор NMDA-рецепторов и CNQX (25 мкМ) — блокатор AMPA- и каинатных рецепторов, таким образом исключая возбуждающую синаптическую активность, опосредованную глутаматом. Время воздействия тетродотоксина, D-AP5 и CNQX — 20–30 мин. Для выделения из тормозной фракции глицинергических мПСП использовали бикикуллин (20 мкМ) — избирательный антагонист ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов, для выделения ГАМКергических мПСП — стрихнин (1 мкМ) — блокатор глициновых рецепторов.

D-AP5 и CNQX получены от фирмы RBI (США); тетродотоксин, бикикуллин и стрихнин — от фирмы Sigma (США). Для проведения фармакологических тестов использовали следующие вещества: EGLU (100–200 мкМ) — блокатор мГлуР группы II; MAP4 (100–200 мкМ) — блокатор мГлуР группы III; L-AP4 (1 мМ) — агонист мГлуР группы III; факлофен (phaclofen, 200 мкМ) — блокатор ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов. EGLU, MAP4, L-AP4 и факлофен получены от фирмы Tocris (Англия).

## Результаты

Миниатюрная спонтанная синаптическая активность мотонейронов исследована в условиях суперфузии изолированных сегментов поясничного утолщения спинного мозга нормальным по ионному составу физиологическим раствором, содержащим 1.0 мкМ тетродотоксина, блокирующего спайкобусловленные синаптические по-

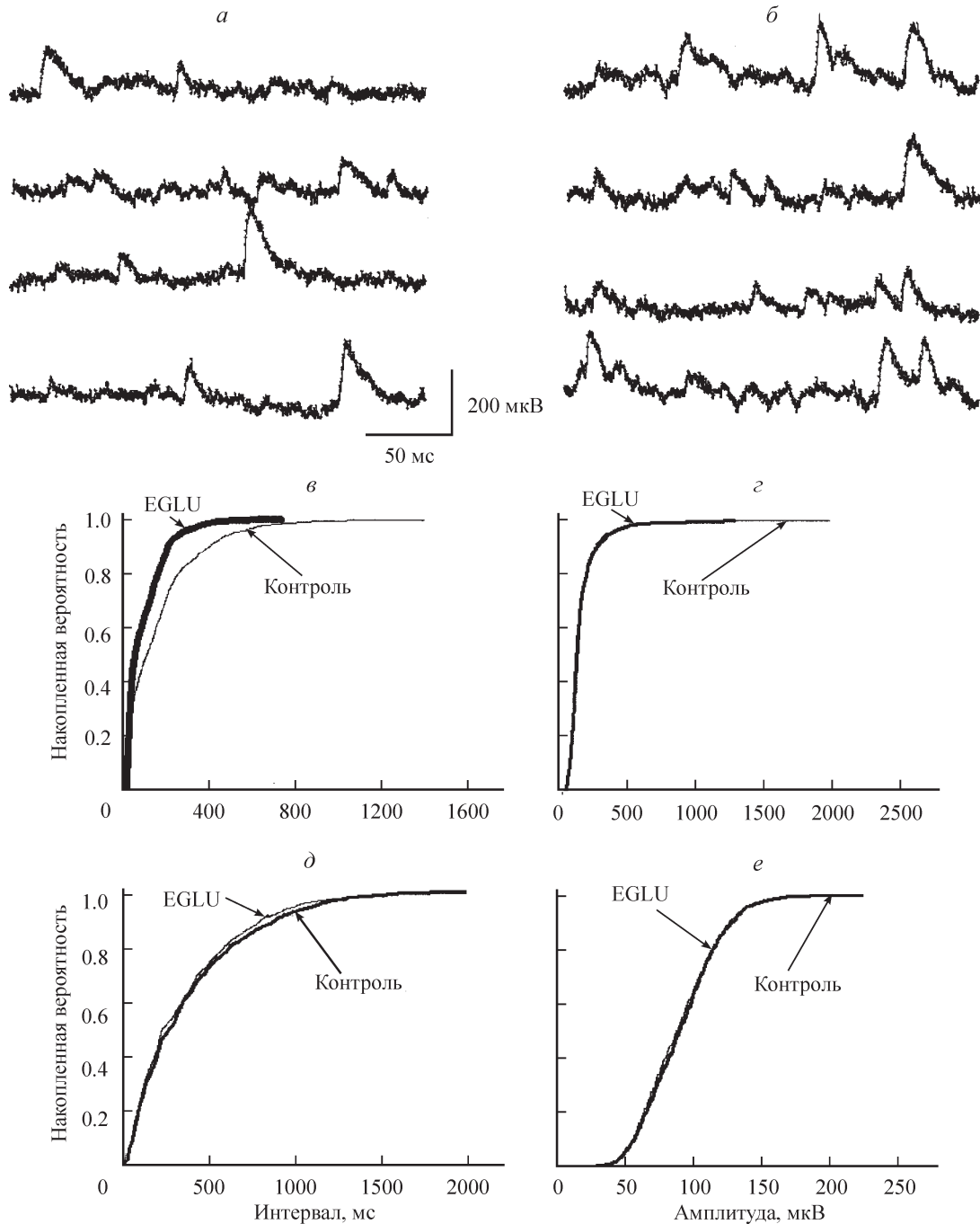


Рис. 1. Влияние антагониста мГлуР II группы на частоту (*в*, *д*) и амплитуду (*з*, *е*) миниатюрных постсинаптических потенциалов (мПСП) мотонейронов.

*а*, *б* — мПСП соответственно в контроле и под воздействием 100 мкМ EGLU; *в*, *з* — распределения вероятностей встречаемости различных интервалов между мПСП и их амплитуд; *д*, *е* — распределения вероятностей встречаемости различных интервалов между мПСП и их амплитуд другого мотонейрона при аппликации 200 мкМ EGLU.

тенциалы. Все компоненты миниатюрной активности были деполяризационными, так как тормозные гиперполяризационные постсинаптические потенциалы в течение 1-х мин отведения изменяли полярность вследствие быстрой диффузии ионов хлора из микроэлектрода в клетку и близости значений МП и потенциала реверсии ГАМК- и глицинергических реакций (Sharovalov, 1980). Средняя частота мПСП широко варьировала в разных мотонейронах от 10 до 95 с<sup>-1</sup>, средняя амплитуда — от 90 до 250 мкВ. Для исследования роли мГлуР II и III групп

в модуляции миниатюрной синаптической активности мотонейронов использовали селективные лиганды этих групп мГлуР.

Суперфузия спинного мозга в течение 15—25 мин раствором, содержащим 100—200 мкМ EGLU (антагонист мГлуР II группы), приводила к увеличению частоты мПСП в среднем на 52.8 ± 30.2 % (*n* = 4) без значимых изменений амплитуды потенциалов в 4 из 6 исследованных мотонейронов, в 2 мотонейронах реакция на воздействие EGLU отсутствовала. На рис. 1 представлены

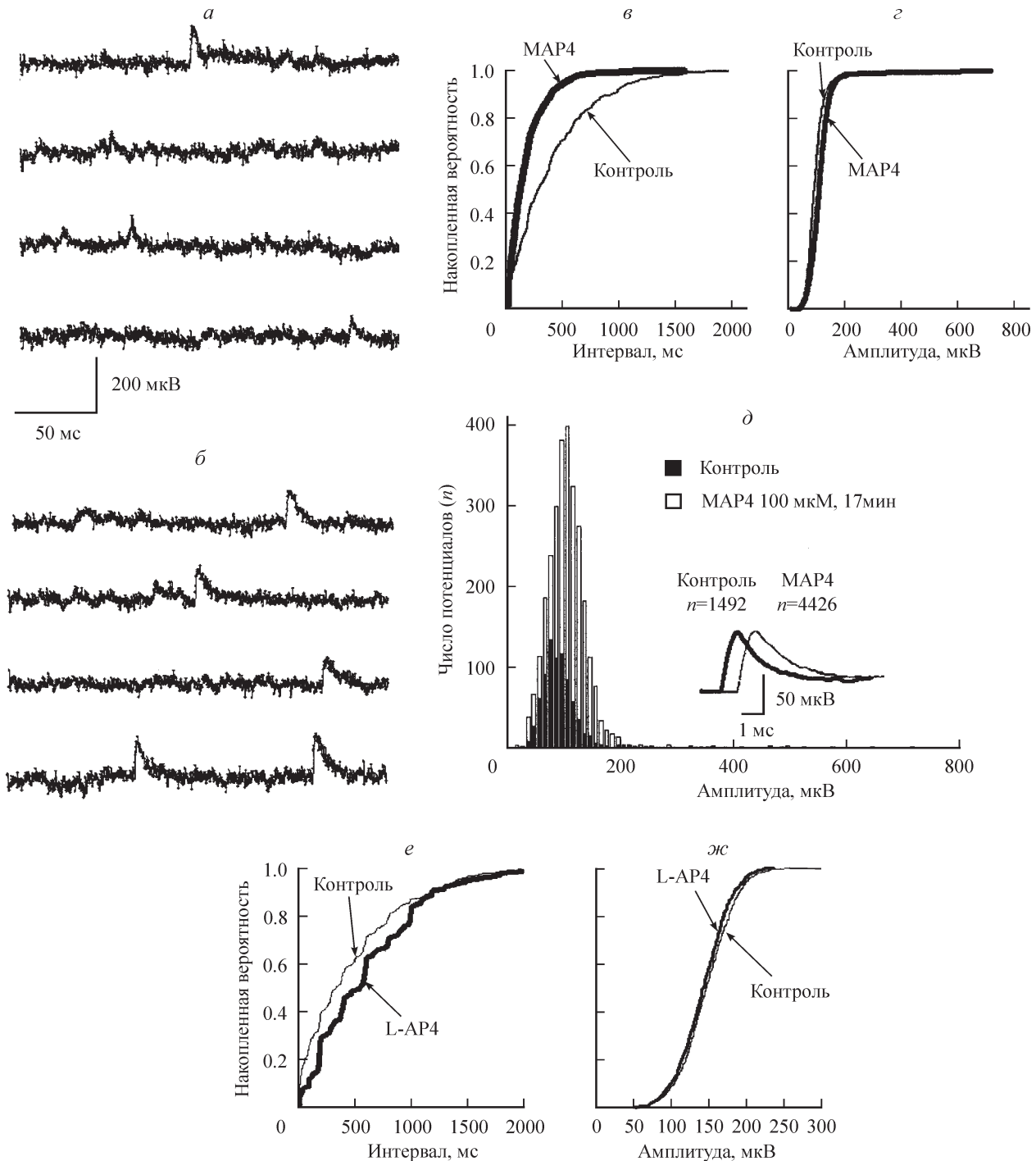


Рис. 2. Влияние лигандов мГлуР III группы на частоту и амплитуду мПСП мотонейронов.

*a, б* — мПСП соответственно в контроле и под воздействием 100 мкМ MAP4; *в, г* — распределения вероятностей встречаемости различных временных интервалов между мПСП и их амплитуд в контроле и после воздействия MAP4; *д* — гистограмма распределений амплитуд мПСП этого мотонейрона и усредненные мПСП в контроле и после воздействия MAP4; *е, ж* — влияние L-AP4 на частоту и амплитуду мПСП другого мотонейрона.

записи индивидуальных мПСП до (*a*) и после воздействия EGLU (*б*) и графики накопленных вероятностей для частоты (*в*) и амплитуды (*г*) мПСП мотонейрона, в котором средняя частота мПСП под влиянием 100 мкМ EGLU увеличивалась на 81.6 % (от 53.9 до 97.9 с<sup>-1</sup>), амплитуда не изменялась (средние значения до и после воздействия EGLU — 156 и 157 мкВ). В другом мотонейроне аппликация 200 мкМ EGLU практически не изменяла частоту (*д*) и амплитуду (*е*) мПСП (в контроле 27.54 с<sup>-1</sup> и

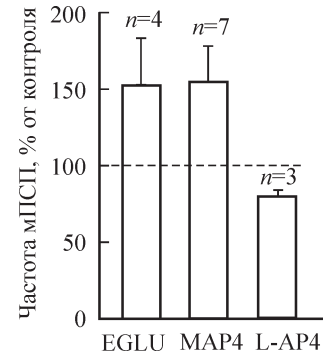
84 мкВ, а после воздействия 28.08 с<sup>-1</sup> и 88 мкВ соответственно).

Антагонист мГлуР III группы MAP4 (100—200 мкМ) во всех исследованных мотонейронах увеличивал частоту мПСП в среднем на  $54.7 \pm 23.7\%$  ( $n = 7$ ), не изменяя их средней амплитуды. На рис. 2, *a—д* представлены результаты анализа реакции мотонейрона, средняя частота мПСП которого увеличилась на 30.8 % (от 25.94 до 33.92 с<sup>-1</sup>), а средняя амплитуда практически не измени-

Рис. 3. Сравнение эффективности влияний лигандов мГлуР II и III групп на частоту миниатюрной активности мотонейронов.

Представлены отношения частоты мПСП после аппликации антагонистов мГлуР II и III групп (EGLU и MAP4 соответственно) и агониста мГлуР III группы L-AP4 к частоте мПСП в контроле (100 %).

лась (110 и 106 мкВ). Гистограмма распределений амплитуд мПСП (рис. 2, д), зарегистрированных в контроле и после воздействия MAP4, демонстрирует увеличение вклада высокоамплитудных групп потенциалов, появление которых, очевидно, связано с повышением вероятности случайных совпадений во времени мПСП при увеличении их частоты. Сравнение усредненных мПСП показывает отсутствие изменений не только амплитуды, но и временных параметров мПСП. Агонист мГлуР III группы L-AP4 подавлял частоту мПСП в 3 из 5 исследованных мотонейронов в среднем на  $21.8 \pm 5.2\%$  ( $n = 3$ ), не изменяя их средней амплитуды. На рис. 2, е, ж представ-



лены результаты анализа реакции мотонейрона, частота мПСП которого уменьшалась на 20.8 % (от 27.4 до 19.7 с<sup>-1</sup>), а амплитуда практически не изменилась (133 и 130 мкВ). В двух мотонейронах реакция на воздействие L-AP4 отсутствовала. Сравнение эффективности влия-

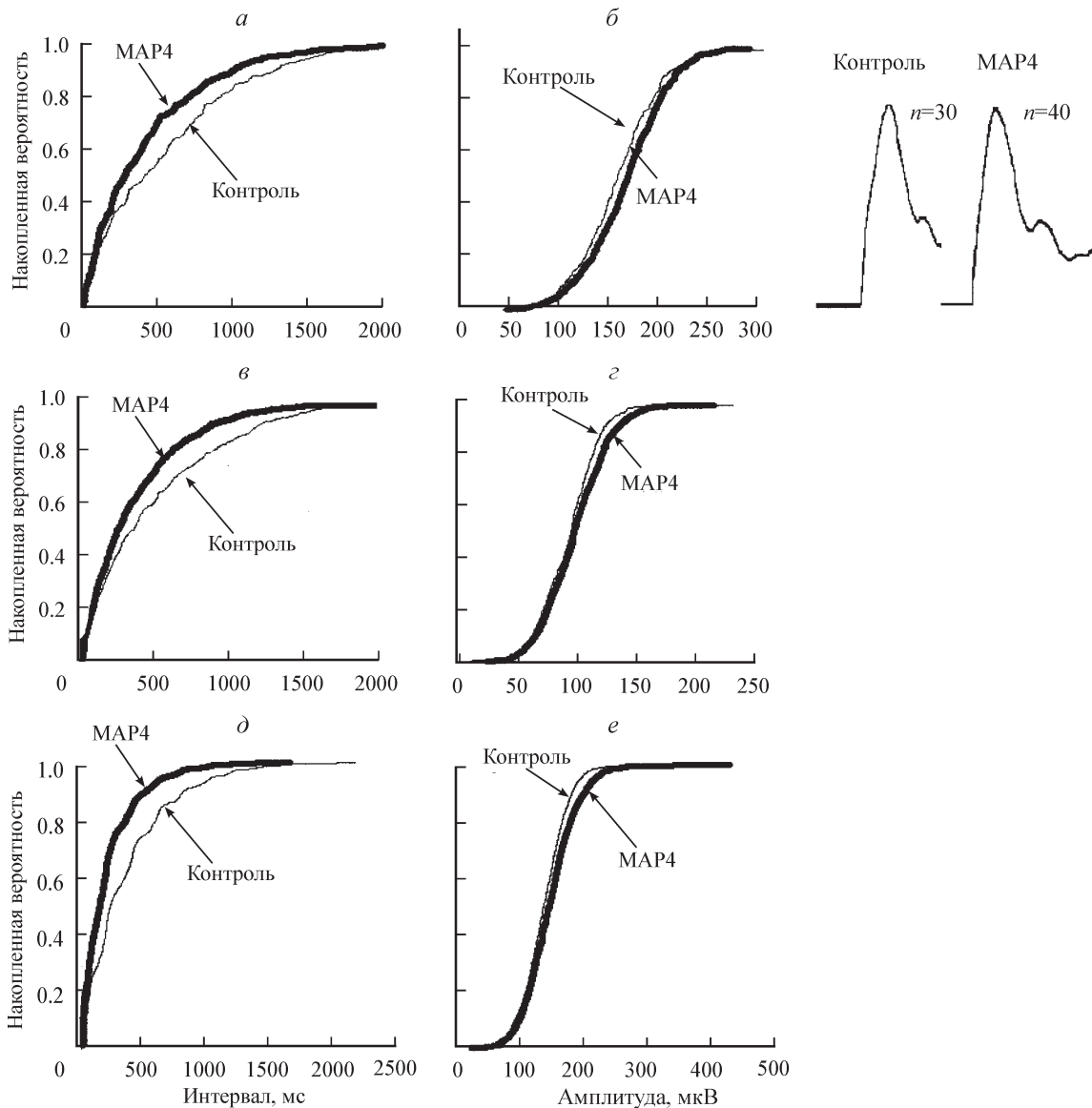


Рис. 4. Влияние антагониста мГлуР III группы MAP4 на тормозную фракцию миниатюрной активности и ее компоненты в индивидуальных мотонейронах.

a, б — влияние аппликации MAP4 на частоту и амплитуду мПСП (на б дополнительно представлены усредненные мПСП в контроле и после воздействия MAP4); в—е — влияние MAP4 на частотные и амплитудные характеристики глицинергических мПСП (в, з) и ГАМКергических мПСП (д, е).

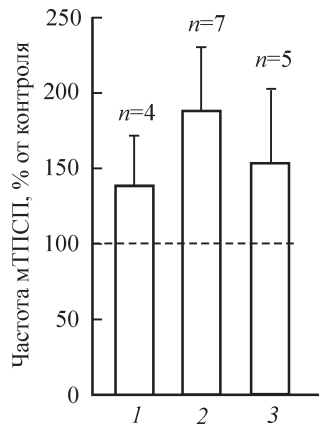


Рис. 5. Сравнение эффективности влияний, опосредованных мГлуР III группы, на частоту тормозной миниатюрной активности и ее глицин- и ГАМКергической фракций.

Представлены отношения средней частоты мТПСП (1), глицинергических мТПСП (2) и ГАМКергических мТПСП (3) после аппликации антагониста мГлуР III группы MAP4 к их частоте в контроле (100 %).

ний лигандов мГлуР II и III групп на частоту мТПСП представлено на рис. 3.

Фармакологическая изоляция тормозной фракции спонтанной миниатюрной активности достигалась блокированием глутаматергических ионотропных рецепторов, т. е. в условиях суперфузии препарата раствором, содержащим тетродотоксин, D-AP5 и CNQX, регистрировались мТПСП. Частота мТПСП по отношению к частоте общей миниатюрной активности составлял в среднем  $24.2 \pm 9.3\%$  ( $n = 3$ ). Частота глицинергических мТПСП (после блокады ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов бикакуллином) составляла  $80.3 \pm 11.8\%$  ( $n = 5$ ) от частоты общей

тормозной миниатюрной активности, а частота ГАМКергических мТПСП (после блокады глициновых рецепторов стрихнином) —  $45.2 \pm 11.7\%$  ( $n = 4$ ). В условиях блокады глицинергической или ГАМКергической фракций общей тормозной миниатюрной активности из нее исключаются смешанные мТПСП, обусловленные совместным выделением глицина и ГАМК из одной везикулы, а сохранившиеся компоненты смешанных мТПСП дополняют или глицин-, или ГАМК-опосредованную фракцию.

Антагонист мГлуР III группы MAP4 повышал частоту тормозной фракции миниатюрной активности в среднем на  $40.6 \pm 30.2\%$  ( $n = 4$ ). На рис. 4, а, б представлен результат аппликации MAP4, которая вызывала рост частоты мТПСП мотонейрона на  $56.4\%$  (от  $9.4$  до  $14.7\text{ с}^{-1}$ ) без изменения средней амплитуды ( $144$  и  $149\text{ мкВ}$ ). Антагонист мГлуР III группы MAP4 ( $100$ — $200\text{ мкМ}$ ) во всех исследованных мотонейронах увеличивал частоту глицинергических мТПСП (в присутствии блокатора ГАМКергических рецепторов бикакуллина) в среднем на  $97.6 \pm 20.7\%$  ( $n = 7$ ), не изменяя их средней амплитуды. На рис. 4, в, г представлены графики накопленных вероятностей для частоты (в) и амплитуды (г) глицинергических мТПСП до и после аппликации MAP4 в случае максимальной реакции. Средняя частота мТПСП мотонейрона увеличивалась от  $9.47$  до  $19.74\text{ с}^{-1}$ , средняя амплитуда практически не изменилась ( $87$  и  $90\text{ мкВ}$ ). Влияние MAP4 на фармакологически изолированную ГАМКергическую фракцию мТПСП (в присутствии блокатора глициновых рецепторов стрихнина) оказалось менее эффективным: частота мТПСП увеличивалась в среднем на  $54.6 \pm 20.8\%$  ( $n = 5$ ) без значимых изменений амплитуды. Максимальная реакция представлена на рис. 4, д, е.

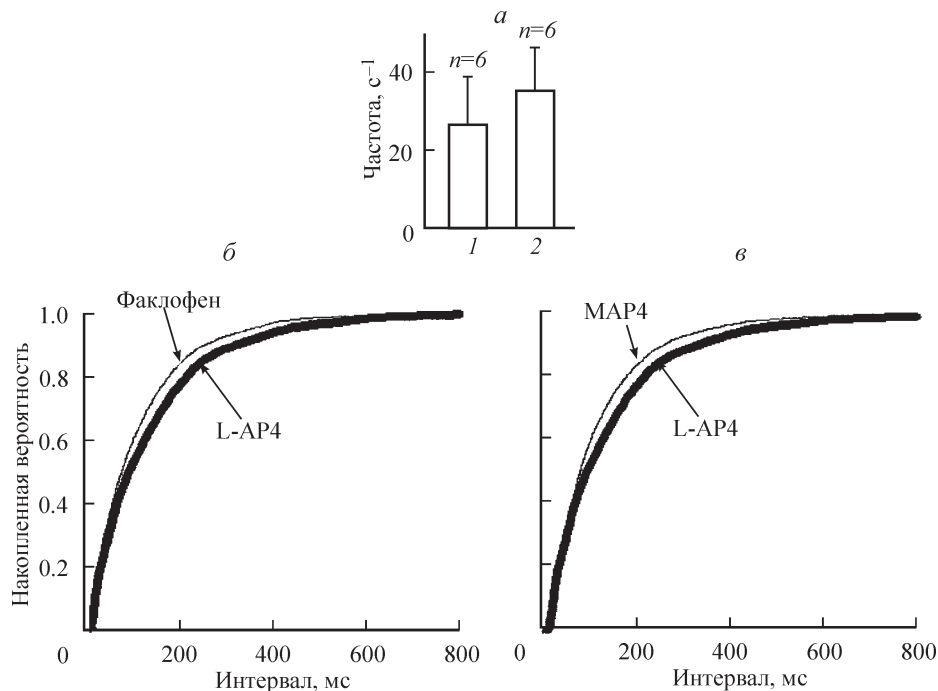


Рис. 6. Совместные влияния лигандов метаботропных ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов и мГлуР III группы.

а — сравнение средних значений частоты ГАМК-опосредованных мТПСП в норме (1) и под действием блокатора ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов факлофена (2); б — влияние агониста мГлуР III группы L-AP4 на частоту ГАМКергических мТПСП после предварительной блокады ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов факлофеном; в — снятие эффекта L-AP4 в результате последующей аппликации MAP4.

Результаты влияния MAP4 на частоту тормозной миниатюрной активности и ее глицин- и ГАМКергическую фракции представлены на рис. 5.

Для последующего сопоставления эффектов, опосредованных мГлуР и метаботропными ГАМК<sub>B</sub>-рецепторами, проведено сравнение средних значений частоты ГАМК-опосредованных мТПСР в норме ( $25.9 \pm 13.3 \text{ с}^{-1}$ ,  $n = 6$ ) и в условиях блокады ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов факлофеном ( $34.8 \pm 11.8 \text{ с}^{-1}$ ,  $n = 6$ ). Увеличение частоты мТПСР во второй группе нейронов на 34.4 % (рис. 6, а) свидетельствует об однонаправленности пресинаптических модулирующих влияний, опосредованных ГАМК<sub>B</sub>-рецепторами и мГлуР, и о тонической активности пресинаптических ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов мотонейронов лягушки.

Проведено предварительное исследование возможности кооперативного модулирующего влияния, опосредованного пресинаптическими метаботропными гетерорецепторами (мГлуР III группы) и ауторецепторами (ГАМК<sub>B</sub>-рецепторы), на миниатюрную ГАМКергическую активность. В двух экспериментах в условиях блокады ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов частота ГАМКергических мТПСР уменьшалась на 18.5 и 20 % после активации мГлуР III агонистом L-AP4 (рис. 6, б). Эффект L-AP4 полностью снимался последующей аппликацией MAP4 (рис. 6, в).

## Обсуждение

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о выраженном модулирующем влиянии, опосредованном мГлуР II и III групп, на миниатюрную спонтанную активность мотонейронов спинного мозга лягушки. Эффективность модуляции синаптической передачи и локализацию действия мГлуР оценивали по изменениям частоты и амплитуды мТПСР. Тот факт, что использованные нами антагонисты и агонист мГлуР существенно изменяли частоту мТПСР и практически не влияли на их среднюю амплитуду, говорит о том, что блокируемые (или активируемые) этими агентами рецепторы локализованы на пресинаптических терминалах волокон, образующих синапсы непосредственно на мотонейронах, и угнетают процесс спонтанного выделения передатчиков. Такая трактовка основана на исследованиях нервно-мышечной передачи (Katz, 1962) и широко используется для интерпретации результатов исследований роли мГлуР в различных отделах ЦНС (Cartmell, Schoepf, 2000).

В большинстве экспериментов мы использовали блокаторы мГлуР, и положительный результат в такой постановке опыта позволяет предположить, что мГлуР, локализованные на синаптических входах мотонейронов лягушки, тонически активны. Отсутствие эффекта блокаторов мГлуР обычно трактуется как свидетельство отсутствия тонической активности мГлуР (Tascolla et al., 2004). Наше предположение подтверждается также результатом сравнения эффективности аппликации антагониста (MAP4) и агониста (L-AP4) мГлуР III группы. Антагонист обнаружил более высокую эффективность: MAP4 повышал частоту мТПСР во всех исследуемых мотонейронах в среднем на  $54.7 \pm 23.7 \%$  ( $n = 7$ ), а L-AP4 вызывал снижение частоты мТПСР в 3 мотонейронах из 5 в среднем на  $21.8 \pm 5.2 \%$ .

Считается, что тоническая активация мГлуР осуществляется за счет эндогенного экстрацеллюлярного глутамата (растекание — spillover — глутамата из синаптической щели нейрона и глутамата, выделяемого глиальными клетками), обеспечивающего диффузное действие на пресинаптические мГлуР, расположенные на возбуждающих и тормозных терминалах (Gerber et al., 2000; Mitchell, Silver, 2000; Semyanov, Kullmann, 2000; Barker et al., 2002; Семьянов, 2004; Fellin, Carmignoto, 2004). Отмечается, что мГлуР II и III групп активируются более низкими концентрациями глутамата, чем ионотропные глутаматные рецепторы (Pin, Duvoisin, 1995).

Следует отметить некоторое различие влияний антагонистов мГлуР II и III групп, которое выразилось в отсутствии в 2 из 6 мотонейронов реакции на аппликацию EGLU (блокатор мГлуР II группы), тогда как аппликация MAP4 (блокатор мГлуР III группы) во всех тестируемых мотонейронах вызывала увеличение частоты мТПСР. Эффективность действия антагонистов этих двух групп мГлуР была одинаковой: в случаях блокады мГлуР II группы рост частоты мТПСР составлял в среднем  $52.8 \pm 30.2 \%$  ( $n = 4$ ), блокада мГлуР III группы повышала частоту мТПСР на  $54.7 \pm 23.7 \%$  ( $n = 7$ ). Отсутствие в некоторых случаях эффекта блокатора мГлуР II группы может быть связано с показанными в морфологических исследованиях различиями локализации мГлуР этих групп: мГлуР III группы экспрессированы в пресинаптических мембранах на границе синаптической щели и даже субсинаптически в активной зоне, а мГлуР II — экстраинаптически диффузно в претерминальной зоне (Petralia et al., 1996; Shigemoto et al., 1996, 1997; Corti et al., 2002).

Для исследования гетеросинаптических влияний, опосредованных мГлуР, осуществляли фармакологическую изоляцию тормозной фракции миниатюрной активности мотонейронов (совместная аппликация тетродотоксина, D-AP5 и CNQX) и последующую блокаду либо ГАМКергических мТПСР бикакуллином, либо глицинергических мТПСР стрихнином. Вклад глицинергических мТПСР в общую тормозную фракцию составил  $80.3 \pm 11.8 \%$  ( $n = 5$ ), что свидетельствует о доминирующей роли глицина в качестве тормозного медиатора в спинном мозге лягушки (Полина и др., 2006) и соответствует данным, полученным в исследованиях мотонейронов спинного мозга и ствола головного мозга млекопитающих (Jonas et al., 1998; O'Brien, Berger, 1999; Donato, Nistri, 2000; Russier et al., 2002). Следует отметить вариабельность соотношения глицин- и ГАМКергических мТПСР в общей тормозной миниатюрной активности индивидуальных мотонейронов лягушки, что соответствует электрофизиологическим (Jonas et al., 1998) и иммуногистохимическим (Somogyi, 2002) данным, полученным в исследованиях спинного мозга крысы.

Антагонист мГлуР III группы MAP4 увеличивал частоту и глицин-, и ГАМКергических мТПСР, не изменяя их средней амплитуды, но действовал в отношении их с разной эффективностью: влияние на фармакологически изолированную глицинергическую фракцию мТПСР значительно превосходило таковое на ГАМКергическую фракцию (увеличение частоты мТПСР в среднем на  $97.6 \pm 20.7$  и  $54.6 \pm 20.8 \%$  соответственно). Возможным объяснением различной степени модуляции двух фракций мТПСР, вызываемой антагонистом мГлуР III группы MAP4, может быть вероятность разной локализации

(пространственной сегрегации) постсинаптических ГАМК<sub>A</sub>- и глициновых рецепторов в синапсах на мембране мотонейронов лягушки, как это показано для нейронов спинного мозга крысы (Todd et al., 1996; Chery, De Koninck, 1999).

Эффективность влияния блокатора мГлуР III группы МАР4 на общую тормозную активность (рост частоты на  $40.6 \pm 31.2\%$ ,  $n = 4$ ) оказалась вариабельной в различных мотонейронах и в среднем менее выраженной, чем эффективность влияния на изолированные глицини- и ГАМКергическую фракции ( $97.6 \pm 20.7$  и  $54.6 \pm 20.8\%$  соответственно). Можно предположить, что в случаях регистрации общей тормозной активности увеличение концентрации тормозных медиаторов в синаптической щели вследствие усиления процесса выделения медиаторов под действием блокады мГлуР усиливает процесс перекрестного торможения (Wu et al., 2002) постсинаптических глициновых и ГАМК-рецепторов, что приводит к окклюзии части тормозных потенциалов и таким образом снижает проявление реакции на блокаду мГлуР.

В ряде работ исследована конвергенция модулирующих влияний, опосредованных мГлуР и метаботропными ГАМК<sub>B</sub>-рецепторами, на синаптическую передачу в различных нейронных популяциях ЦНС (Сао et al., 1997; Jonas et al., 1998; Semyanov, Kullmann, 2000). В работах, выполненных на нейронах спинного мозга и ствола головного мозга крысы, показано, что пресинаптические ГАМК<sub>B</sub>-рецепторы тонически активны (O'Brien et al., 2004) и являются первой мишенью ГАМК, выделяемой из пресинаптических окончаний (Chery, De Koninck, 2000).

Полученные в нашей работе данные свидетельствуют о тонической активности пресинаптических ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов, подавление которой блокатором ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов факлофеном приводит к повышению частоты ГАМКергических мТПСП. Пресинаптические ГАМК<sub>B</sub>-рецепторы и мГлуР III группы выполняют одинаковую функцию — угнетение процесса выделения транмиттера (Сао et al., 1997), используют один и тот же вторичный мессенджер — аденилатциклазу (Каурманн et al., 1997; Xi et al., 1997), но различные дальнейшие пути внутриклеточной реализации (Giustizieri et al., 2005), что ставит вопрос о характере их взаимодействия. В работе, выполненной на мотонейронах спинного мозга крысы (Сао et al., 1997), показано, что антагонист ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов не изменяет потентности агониста мГлуР III группы, а антагонист мГлуР III группы не противодействует депрессирующему влиянию агониста ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов, на основании чего авторы делают вывод о сходстве, но независимости влияний, опосредованных мГлуР III группы и ГАМК<sub>B</sub>-рецепторами. В настоящей работе в условиях блокады ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов наблюдался типичный эффект на аппликацию агониста мГлуР III группы, который полностью снимался антагонистом мГлуР III группы. Этот факт поддерживает вывод о независимости модулирующих влияний, опосредованных этими типами метаботропных рецепторов (Сао et al., 1997).

Работа выполнена при финансовой поддержке программы ОБН РАН (10Б-01) и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 06-04-48533 и 08-04-00098).

## Список литературы

- Кожанов В. М., Карамян О. А., Чмыхова Н. М., Веселкин Н. П., Клеманн Х. П. 2004. Модуляция миниатюрных тормозных потенциалов мотонейронов спинного мозга черепахи метаботропными глутаматными рецепторами группы II. Цитология. 46 (4) : 326—336.
- Кожанов В. М., Карамян О. А., Чмыхова Н. М., Клеманн Х. П. 2001. Модуляция спонтанной синаптической активности мотонейронов спинного мозга черепахи метаботропными глутаматными рецепторами группы II. Нейрофизиология. 33 : 110—118.
- Курчавый Г. Г. 1984. Амплитуда миниатюрных потенциалов в мотонейронах лягушки *Rana ridibunda*. Журн. эволюц. биохим. физиол. 20 (5) : 504—510.
- Мельян З. Э., Кожанов В. М. 1997. Влияние метаботропных глутаматных рецепторов на длительность посттетанических изменений постсинаптических потенциалов в мотонейронах лягушки *Rana ridibunda*. Журн. эволюц. биохим. физиол. 33 (4/5) : 475—483.
- Полина Ю. А., Амахин Д. В., Кожанов В. М., Курчавый Г. Г., Веселкин Н. П. 2006. Три типа тормозных миниатюрных потенциалов в мотонейронах спинного мозга лягушки: возможность ко-медиации ГАМК и глицина. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 92 (1) : 18—26.
- Семьянов А. В. 2004. Диффузная внесинаптическая нейропередача посредством глутамата и ГАМК. Журн. высш. нерв. деятельности. 54 (1) : 68—84.
- Ankri N., Legendre P., Faber D. S., Korn H. 1994. Automatic detection of spontaneous synaptic responses in central neurons. J. Neurosci. Method. 52 : 87—100.
- Barker D. A., Xi Z. X., Shen H., Swanson C. J., Kalivas P. W. 2002. The origin and neuronal function of *in vivo* nonsynaptic glutamate. J. Neurosci. 22 : 9134—9141.
- Berthele A., Boxall S. J., Urban A., Anneser J. M. N., Zieglsberger W., Urban L., Tolle T. R. 1999. Distribution and developmental changes in metabotropic glutamate receptor messenger RNA expression in the rat lumbar spinal cord. Develop. Brain Res. 112 : 39—53.
- Bohlhalter S., Mohler H., Fritschy J. M. 1994. Inhibitory neurotransmission in rat spinal cord: colocalization of glycine- and GABA<sub>A</sub>-receptor at GABAergic synaptic contacts demonstrated by triple immunofluorescence staining. Brain Res. 642 : 59—69.
- Caio C. Q., Evans R. H., Headley P. M., Udvarhelyi P. M. 1995. A comparison of the effect of selective metabotropic glutamate receptor agonists on synaptically evoked whole cell currents of rat spinal ventral horn neurons *in vitro*. Br. J. Pharmacol. 117 : 1457—1462.
- Caio C. Q., Tse H. W., Jane D. E., Evans R. H., Headley P. M. 1997. Metabotropic glutamate receptor antagonists, like GABA<sub>B</sub> antagonists, potentiate dorsal root-evoked excitatory synaptic transmission at neonatal rat spinal motoneurons *in vitro*. Neuroscience. 78 : 243—250.
- Carlton S. M., Hargett G. L., Coggeshall R. E. 2001. Localization of metabotropic glutamate receptors 2/3 on primary afferent axons in the rat. Neuroscience. 105 : 957—969.
- Cartmell J., Schoepp D. D. 2000. Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. J. Neurochem. 75 : 889—907.
- Chery N., de Koninck Y. 1999. Junctional versus extrajunctional glycine and GABA<sub>A</sub> receptor-mediated IPSCs in identified laminar neurons of adult rat spinal cord. J. Neurosci. 19 : 7342—7355.
- Chery N., De Koninck Y. 2000. GABA<sub>B</sub> receptors are the first target of released GABA at lamina I inhibitory synapses in the adult rat spinal cord. J. Neurophysiol. 84 : 1006—1011.
- Colomo F., Erulkar S. D. 1968. Miniature synaptic potentials at frog spinal neurones in the presence of tetrodotoxin. J. Physiol. 199 : 205—221.
- Corti C., Aldegheri L., Somogyi P., Ferraguti F. 2002. Distribution and synaptic localization of metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4) in the rodent CNS. Neuroscience. 110 : 403—420.



- Curtis D. R., Johnson G. A. R. 1974. Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. *Ergeb. Physiol.* 69 : 97—188.
- Donato R., Nistri A. 2000. Relative contribution by GABA or glycine to Cl-mediated synaptic transmission on rat hypoglossal motoneurons *in vitro*. *J. Neurophysiol.* 84 : 2715—2724.
- Fellin T., Carmignoto G. 2004. Neurone-to-astrocyte signaling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J. Physiol.* 559 : 3—15.
- Gerber G., Zhong J., Young D., Randic M. 2000. Group II and group III metabotropic glutamate receptor agonists depress synaptic transmission in the rat spinal cord dorsal horn. *Neuroscience.* 100 : 393—406.
- Giustizieri M., Bernardi G., Mercuri N., Baretta N. 2005. Distinct mechanisms of presynaptic inhibition at GABAergic synapses of rat substantia nigra pars compacta. *J. Neurophysiol.* 94 : 1992—2003.
- Gotani H., Kuno M., Nakamura F., Matsuura S. 1995. Potentiation of excitatory postsynaptic potentials by a metabotropic glutamate receptor agonist (1S,3R-ACPD) in frog spinal motoneurons. *Brain Res.* 689 : 281—288.
- Hackman J. C., Holohean A. M., Davidoff R. A. 1997. Role metabotropic glutamate receptors in the depression of GABA-mediated depolarization of frog primary afferent terminals. *Neuroscience.* 81 : 1079—1090.
- Holohean A. M., Hackman J. C., Davidoff R. A. 1999. Mechanisms involved in the metabotropic glutamate receptor-enhancement of NMDA-mediated motoneurone responses in frog spinal cord. *Br. J. Pharmacol.* 126 : 333—341.
- Ishida M., Saitoh T., Shimamoto K., Ohfune Y., Shinozaki H. 1993. A novel metabotropic glutamate receptor agonist: marked depression of monosynaptic excitation in the newborn rat isolated spinal cord. *Br. J. Pharmacol.* 109 : 1169—1177.
- Jonas P., Bischofberger J., Sandkuhler J. 1998. Corelease of two fast transmitters at a central synapse. *Science.* 281 : 419—424.
- Katsurabayashi S., Kubota H., Higashi H., Akaike N., Ito Y. 2004. Distinct profiles of refilling of inhibitory neurotransmitters into presynaptic terminals projecting to spinal neurones in immature rats. *J. Physiol.* 560 : 469—478.
- Katz B. 1962. The transmission of impulses from nerve to muscle and the subcellular unit of synaptic action. *Proc. R. Soc. Biol.* 155 : 455—467.
- Katz B., Miledi R. 1963. A study of spontaneous miniature potentials in spinal motoneurons. *J. Physiol.* 168 : 389—422.
- Katz B., Miledi R. 1967. A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. *J. Physiol.* 192 : 407—436.
- Kaupmann K., Huggel K., Heid J., Flor P. J., Bischoff S., Mickel S. J., McMaster G., Angst C., Bittiger H., Froestl W., Bettler B. 1997. Expression cloning of GABA<sub>B</sub> receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature.* 386 : 239—246.
- Krnjevic K. 1974. Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. *Physiol. Rev.* 54 : 418—540.
- Kudo Y. 1978. The pharmacology of amphibian spinal cord. *Prog. Neurobiol.* 11 : 1—76.
- Li H., Ohishi H., Kinoshita A., Shigemoto R., Nomura S., Mizuno N. 1997. Localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR7, in axon terminals of presumed nociceptive, primary afferent fibers in the superficial layers of the spinal dorsal horn: an electron microscope study in the rat. *Neurosci. Lett.* 223 : 153—156.
- Mitchell S. J., Silver R. A. 2000. Glutamate spillover suppresses inhibition by activating presynaptic mGluRs. *Nature.* 404 : 498—502.
- O'Brien J. A., Berger A. J. 1999. Cotransmission of GABA and glycine to brain stem motoneurons. *J. Neurophysiol.* 82 : 1638—1641.
- O'Brien J. A., Sebe J. Y., Berger A. J. 2005. GABA<sub>B</sub> modulation of GABA<sub>A</sub> and glycine receptor-mediated synaptic currents in hypoglossal motoneurons. *Respiratory Physiol. Neurobiol.* 14 : 35—45.
- Petralia R. S., Wang Y. X., Niedzielski A. S., Wenthold R. J. 1996. The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience.* 71 : 949—976.
- Pin J. P., Duvoisin R. 1995. Metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology.* 34 : 1—26.
- Pook P. C.-K., Sunter D. C., Udvarhelyi P. M., Watkins J. C. 1992. Evidence for presynaptic depression of monosynaptic excitation in neonatal rat motoneurons by (1S-3S)- and (1S-3R)-ACPD. *Exp. Physiol.* 77 : 529—532.
- Russier M., Kopysova I. L., Ankri N., Ferrand N., Debanne D. 2002. GABA and glycine corelease optimizes functional inhibition in rat brainstem motoneurons *in vitro*. *J. Physiol.* 541 : 123—137.
- Semyanov A., Kullmann D. M. 2000. Modulation of GABAergic signaling among interneurons by metabotropic glutamate receptors. *Neuron.* 25 : 663—672.
- Shapovalov A. I. 1980. Amino acids as excitatory and inhibitory neurotransmitters in the spinal cord of lower vertebrates. In: *Neurotransmitters: comparative aspects.* Budapest: Academiai Kiado. 471—489.
- Shigemoto R., Kinoshita A., Wada E., Nomura S., Ohishi H., Takada M., Flor P. J., Neki A., Abe T., Nakanishi S., Mizuno N. 1997. Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 17 : 7503—7522.
- Shigemoto R., Kulik A., Roberts J. D., Ohishi H., Nusser Z., Kaneko T., Somogyi P. 1996. Target-cell-specific concentration of metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. *Nature.* 381 : 523—525.
- Somogyi J. 2002. Differences in ratios of GABA, glycine and glutamate immunoreactivities in nerve terminals on rat hindlimb motoneurons: a possible source of postsynaptic variability. *Brain Res. Bull.* 59 : 151—161.
- Taccola G., Marchetti C., Nistri A. 2004. Role of group II and III metabotropic glutamate receptors in rhythmic patterns of the neonatal rat spinal cord *in vitro*. *Exp. Brain Res.* 156 : 495—504.
- Tang F. R., Sim M. K. 1999. Pre- and/or post-synaptic localization of metabotropic glutamate receptor 1 alpha (mGluR 1 alpha) and 2/3 (mGluR2/3) in rat spinal cord. *Neurosci. Res.* 34 : 73—78.
- Todd A. J., Watt C., Spike R. C., Sieghart W. 1996. Colocalization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord. *J. Neurosci.* 16 : 974—982.
- Valerio A., Paterlini M., Boifana M., Memo M., Spano P. 1997. Metabotropic glutamate receptor mRNA expression in rat spinal cord. *Neuroreport.* 8 : 2695—2699.
- Vesselkin N. P., Rio J. P., Adanina V. O., Reperant J. 2000. GABA- and glycine-immunoreactive terminals contacting motoneurons in lamprey spinal cord. *J. Chem. Neuroanat.* 19 : 89—90.
- Wu L.-J., Li Y., Xu T.-L. 2002. Co-release and interaction of two inhibitory co-transmitters in rat sacral dorsal commissural neurons. *Neuroreport.* 13 : 977—981.
- Xi Z.-X., Yamada K., Tsurusaki M., Akasu T. 1997. Baclofen reduces GABA<sub>A</sub> receptor responses in acutely dissociated neurons of Bullfrog dorsal root ganglia. *Synapse.* 26 : 165—174.

THE ROLE OF GROUP II AND III METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTORS  
IN MODULATION OF MINIATURE SYNAPTIC ACTIVITY  
IN FROG SPINAL CORD MOTONEURONS

O. A. Karamian, V. M. Kozhanov, I. S. Masalov, N. M. Chmykhova,<sup>1</sup> N. P. Vesselkin

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg;  
e-mail: <sup>1</sup> nchmykhova@mail.ru

The results of present work demonstrate significant modulating effects mediated by group II and III mGluRs on miniature postsynaptic potentials (mPSP) of the frog spinal motoneurons. The mode of group II and III mGluRs ligands influences, i. e. the changes in the mPSPs average frequency without significant changes in their average amplitude, suggests the presynaptic mechanism of modulation by the change in transmitter release. Selective antagonists of group II and III mGluRs (EGLU and MAP4) increased the average frequency of mPSPs by  $52.8 \pm 30.2\%$  (in 4 of 6 motoneurons) and by  $54.7 \pm 23.7\%$  (in all 7 motoneurons), respectively. Application of the group III mGluRs agonist LAP4 decreased the mPSPs frequency by  $21.8 \pm 5.2\%$  in 3 of 5 motoneurons. The efficiency of the antagonist usage and comparative low efficiency of the agonist suggest that presynaptic mGluRs at motoneuronal synapses under normal condition possess some level of tonic activity. The lack of group II mGluR antagonist effect on some motoneurons appears to be explained by specific localization of the group II mGluRs in preterminal area which is distant from the transmitter release site. The hetero-receptor modulation of pharmacologically isolated inhibitory miniature activity and its glycine- and GABAergic fractions by group III mGluRs was investigated. MAP4 application has been shown to increase the glycine-mediated mPSPs frequency more than GABA-mediated mPSPs frequency: in average by  $97.6 \pm 20.7\%$  ( $n = 7$ ) and  $54.6 \pm 20.8\%$  ( $n = 5$ ), respectively. This difference may be due to the segregation of the postsynaptic glycine- and GABA-receptors. The preliminary examination of the convergence of the presynaptic mGluRs and metabotropic GABA<sub>B</sub> receptors influences on GABA-mediated IPSPs was undertaken. It has been shown that presynaptic GABA<sub>B</sub> receptors are tonically active under normal condition. Under condition of GABA<sub>B</sub> receptor blockage by phaclofen, the application of group III mGluR agonist L-AP4 elicited typical effect which was completely taken off by subsequent application of the group III mGluRs antagonist MAP4. This result is in accordance with the assumption that the effects mediated by GABA<sub>B</sub> receptors and mGluRs are independent.

**Key words:** neuromodulation, frog, spinal motoneurons, miniature postsynaptic potentials, metabotropic glutamate receptors.

---