

## Osnovi glutamatergičke neurotransmisije

Dragan R. Milovanović, Slobodan M. Janković

Medicinski fakultet, Institut za farmakologiju, Kragujevac

**K l j u č n e r e č i :** neurotransmiteri; glutamati; sinapse; amino kiseline, ekscitatorne; receptori, glutamatski.

**K e y w o r d s :** neurotransmitters; glutamates; synapses; excitatory amino acids; receptors, glutamate.

### Uvod

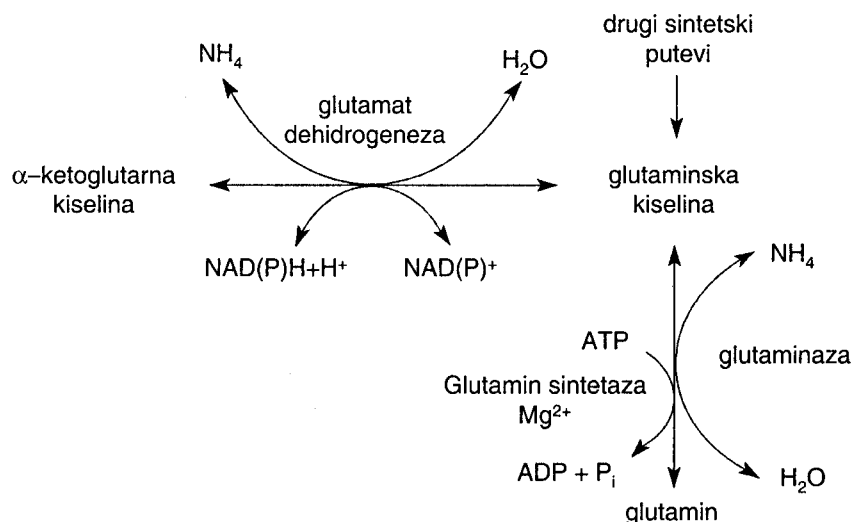
Glutaminska kiselina ima veoma važnu ulogu u intermedijarnom metabolizmu, ali je takođe (u obliku svog anjona glutamata) jedan od najznačajnijih endogenih ekscitatornih neurotransmitera. S obzirom na to da glutamat učestvuje u regulaciji mnogih telesnih funkcija i razvoju pojedinih patoloških procesa u telu, interes za izučavanje glutamatergičke neurotransmisije danas je naglo narastao, budeći nadu za skorim otkrićem novih, efikasnijih lekova i terapijskih postupaka.

### Istorijat i sinteza glutamata

Ekscitatorna dejstva glutamata i nekoliko srodnih aminokiselina na neurone su otkrivena još 50-ih godina 20. veka (1). Tokom naredne 3 decenije obavljena je klasična farmakološka tipizacija dejstava glutamata upotrebom prototipnih agonista i antagonista jonotropnih receptora za glutamat (iGluR), dok je tipizacija metabotropnih glutamatergičkih receptora (mGluR) bila tek u začetku (2). Uvođenje metoda molekulske biologije, krajem 80-ih, označilo je prekretnicu u daljim istraživanjima jer je prvo izolovana subjedinic

jonotropnog receptora (GluR1) (3), a nedugo zatim i prvi metabotropni glutamatergički receptor, mGluR<sub>1a</sub> (4, 5). Slede brojna istraživanja koja su omogućila postavljanje današnje klasifikacije GluR, izradu modela glutamatergičke sinapse i sprovođenje prvih kliničkih studija sa ligandima receptora za glutamat.

Glutaminska kiselina je neesencijalna, dikarboksilna,  $\alpha$ -aminokiselina sa 5 ugljenikovih atoma. U telesnim tečnostima se nalazi u obliku svog anjona, glutamata. Putevi intermedijarnog metabolizma glutamata u telu su izuzetno složeni i još uvek nisu potpuno poznati. Kako njihov detaljan opis prevazilazi temu ovog rada, na slici 1 su prikazani samo oni metabolički putevi koji su najznačajniji za proces neurotransmisije: glavni metabolički put za sintezu glutama-



Sl. 1 – Sinteza glutamata i interkonverzija sa glutaminom.

ta, kao i veoma značajna interkonverzija sa glutaminom, koja se dešava i u neuronima i u ćelijama glije (6).

**Glutamatergička sinapsa**

Sinteza glutamata se odvija u citosolu ćelije (neurona). Njegova intraćelijska koncentracija je veoma visoka, u neuronima od 5 do 10 mmol, a u glija ćelijama 0,1 do 5 mmol (7). Glutamat se, pomoću posebnog, vezikularnog nosača, koncentriše u sinaptičkim vezikulama (8) koje mogu da sadrže od 250 do 5 000 molekula glutamata uz dostizanje koncentracije od 40 do 210 mmol, što zavisi od tipa sinapse (9). Na taj način je ukupna količina glutamata u neuronima (engl. *pool*) podeljena na dva dela: metabolički (citosol) i neurotransmiterski (vezikule). U fiziološkim uslovima koncentracija glutamata u ekstracelularnoj tečnosti nervnog tkiva je 0,5–10 μmol (~1–2 μmol), što je oko 1 000 puta manje od njegove intracelularne koncentracije. Pod dejstvom nervnih impulsa dolazi do pražnjenja sinaptičkih vezikula aksona. Zato se koncentracija glutamata u sinaptičkoj pukotini povisi do 3 mmol, a potom duže vreme održava na oko 0,5–1 mol uz lagani i postepeni pad zbog procesa difuzije i preuzimanja (engl. *reuptake*) od strane okolnih specifičnih transportnih nosača (9, 10). Unutar ćelija glije najveći deo glutamata se konvertuje u glutamin koji potom slobodno difunduje nazad u presinaptički završetak i značajnim delom koristi za sintezu glutamata (slika 2).

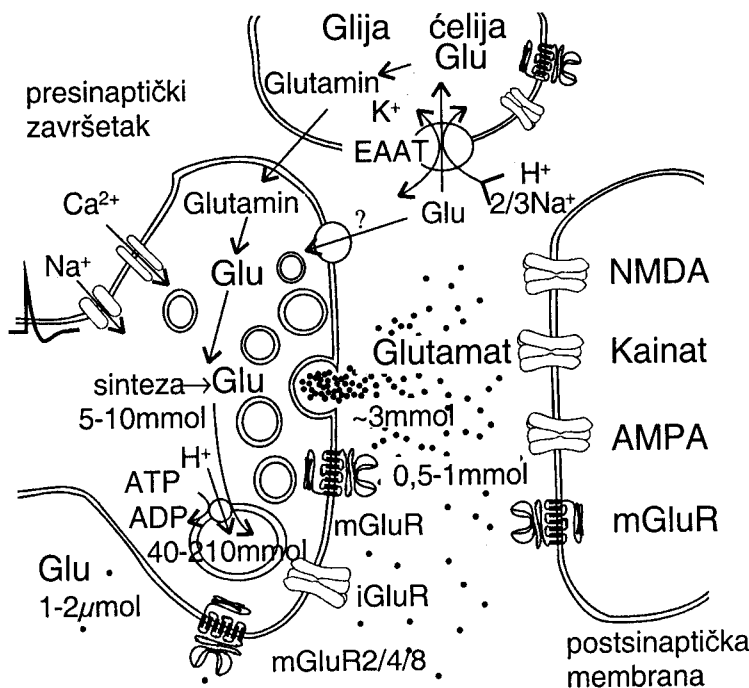
ekscitatornih potencijala (EPSP). Oni su posledica simultane aktivacije iGluR, a delom i mGluR, i sastoje se od dve komponente: brze, snažne i kratkotrajne (posredovane, pre svega, non-NMDA receptorima) i spore, umerene i dugotrajnije (za koju su odgovorni uglavnom NMDA i mGluR receptori). Modulacija glutamatergičke neurotransmisije je još složenija jer se obavlja uz učešće mnogobrojnih i samo delom poznatih mehanizama (11, 12).

**Receptori za glutamat (glutamatergički receptori)**

Receptori za glutamat (GluR) su brojna i međusobno veoma heterogena receptorska familija koja je podeljena u dve grupe, jonotropne (iGluR) i metabotropne receptore (mGluR) (13). Kod nekih beskičmenjaka je otkrivena posebna grupa receptora za glutamat – inhibitorni glutamatergički receptori (IGluR) (14). Oni ne pripadaju porodici pomenutih iGluR već su srodni sa GABA<sub>A</sub>, glicinskim, nikotinskim i 5-HT<sub>3</sub> receptorima.

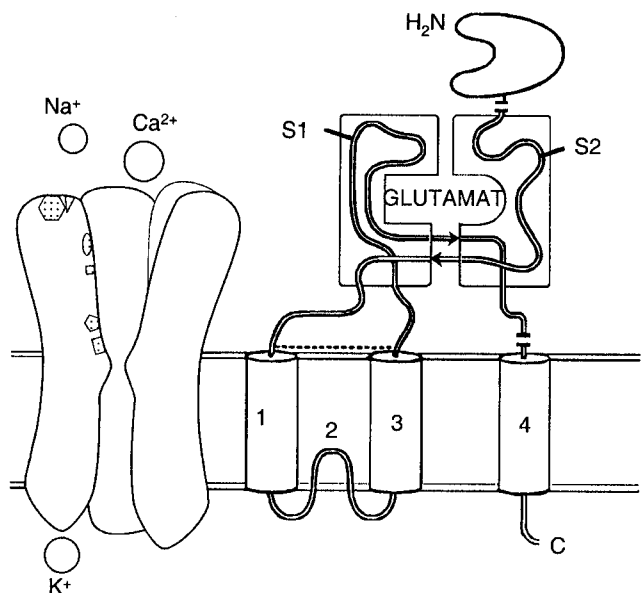
Jonotropni receptori za glutamat pripadaju velikoj superfamiliji receptora jonskih kanala, ali zbog svojih specifičnosti oni čine zasebnu potklasu. Sastoje se od 4 ili 5 proteinskih subjedinica (15) koje su postavljene poprečno u odnosu na ćeljsku membranu tako da formiraju kanal za prolazak jona (slika 3). Receptor može biti formiran od istih (homomer) ili od različitih subjedinica receptorskog tipa (heteromer). Ipak, samo određene kombinacije subjedinica formiraju funkcionalne jonske kanale. Za sada su poznata 3 tipa iGluR, NMDA (N-metil-D-aspartat), AMPA (α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionska kiselina) i kainatski sa ukupno 18 subjedinica iGluR (i većim brojem izoformi) koje su determinisane sa najmanje 6 evoluciono srodnih genskih familija. Osobine iGluR prvenstveno zavise od sastava odgovarajućih subjedinica. Svaka subjedinica ima N-terminalni ekstracelularni deo (sa S1 domenom), tri transmembranska domena (M1, M3, M4), ekstracelularnu petlju između domena M3 i M4 (sa S2 domenom), jedan intramembranski domen (M2) i C-terminalni intracelularni kraj. Za otvaranje/zatvaranje jonskog kanala iGluR odgovorni su M2 domeni. S1 i S2 domeni obrazuju mesto za vezivanje glutamata. Ovi globularni domeni, koji su veoma slični bakterijskim periplazmatskim proteinima (LIVBP, LAOBP), međusobno su spojeni poput šarke na vratima formirajući džep za vezivanje agoniste. Ova struktura podseća na školjku i smatra se da se zatvara kad se unutar nje smesti molekul glutamata, što bi bio signal za aktivaciju receptora (slika 3).

Metabotropni receptori za glutamat (mGluR) su sedmostruki transmembranski proteini sa oko 854–1 179 aminokiselina. Oni pripadaju superfamiliji receptora povezanih



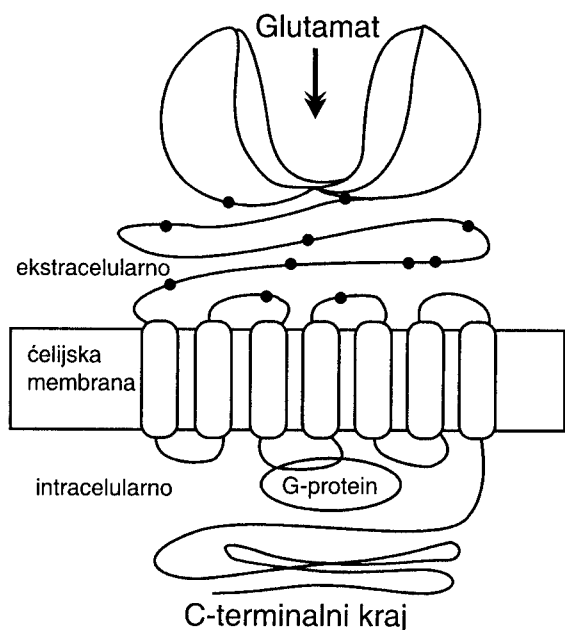
Sl. 2 – Glutamatergička sinapsa.

Elektrofiziološke osobine glutamatergičke sinapse su dosta složene i predmet su intenzivnih istraživanja. Ukratko, glutamatergička neurotransmisija je ekscitatorne prirode jer na postsinaptičkoj membrani dovodi do generisanja snažnih



Sl. 3 – Topologija iGluR (levo) i njegove subjedinice (desno). Receptor je tetra- ili pentamerni proteinski kompleks sa brojnim mestima za vezivanje različitih liganda (prednje subjedinice razmaknute da bi se videli jonski kanal i domeni za ligande).

sa sistemom intracelularnih G-proteina (engl. *G-protein coupled receptors-GPCR*) i sekundarnih intracelularnih glasnika (npr. cAMP) (16). Do sada je otkriveno 8 tipova mGluR (mGluR<sub>1-8</sub>) i veći broj njihovih izoformi (tzv. splajs varijanti). Ovi receptori imaju neuobičajno dugački hidrofilni N-terminalni ekstracelularni deo, sedam hidrofobnih transmembranskih domena i C-terminalni intracelularni kraj (slika 4).



Sl. 4 – Metabotropni recetor za glutamat. Regioni bogati cisteinom označeni su crnim kružićima. Prema Connu (16).

Na N-terminalnom domenu se nalazi mesto za vezivanje glutamata. Ovaj domen sadrži mesta za glikozilaciju i segmente bogate cisteinom, visoko konzervisane strukture unutar mGluR. Prva i treća intracelularna petlja između transmembranskih domena su, takođe, visoko konzervisane unutar familije mGluR, pa se misli da su to mesta interakcije sa G proteinima. Struktura C-terminalnog segmenta varira zavisno od tipa mGluR. Ovaj domen je podložan fosforilaciji i smatra se da učestvuje u transdukciji signala sa receptora u ćeliju.

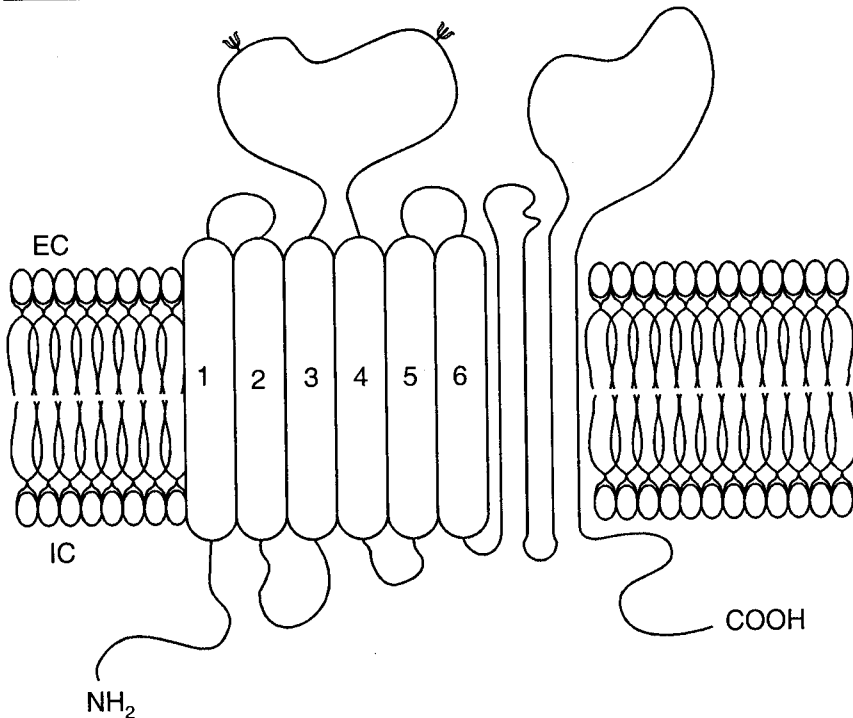
### Ćelijski transporteri za ekscitatorne amino-kiseline

Za sada su dobro poznata dva tipa ćelijskih transportera – jedan, koji se nalazi na ćelijskim membranama i preuzima glutamat iz ekstracelularnog prostora i, drugi, koji je zadužen za transport glutamata iz citosola u sinaptičke vezikule. Dalji tekst je posvećen prvom vidu transporta (engl. *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-dependent glutamate transporters* - (SKDGTs) (10).

Do danas je otkriven veći broj takvih transportera, i to kod čoveka (EAAT1-5), pacova (GLAST, GLT, rEAAC1), miša (mEAAT1,2,4, mGLT-1, mEAAC1), zeca (EAAC1), salamandera (sEAAT1,2,5) i govečeta (bEAAT1). EAAT su glikozilovani transmembranski proteini sa oko 500–600 aminokiselinskih ostataka. Pretpostavlja se da kroz ćelijsku membranu poprečno prolaze bar 6 domena (strukture α-heliksa) i da su i amino- i karboksilni terminalni kraj smešteni intracelularno. Završni karboksilni terminalni kraj je visoko konzervisani domen i najverovatnije formira 4 transmembranske petlje β-strukture (slika 5). EAAT se nalaze širom CNS-a, u retini i perifernim tkivima (crevo, bubrež, srce, jetra, placenta). Procenjuje se da je gustina transportera na ćelijskim membranama neurona i ćelija glije od 2 500/μm<sup>2</sup> do 10 000/μm<sup>2</sup> (17). Najznačajnija (ali ne i jedina) funkcija EAAT je preuzimanje glutamata (odn. aspartata) iz ekstracelularnog prostora kroz ćelijsku membranu. Istovremeno se vrši i kotransport katjona: simport 2 ili 3 Na<sup>+</sup> i jednog H<sup>+</sup>, a antiport jednog K<sup>+</sup>. EAAT imaju i druge, znatno manje poznate funkcije, npr. ponašaju se kao jonski kanali (Cl<sup>-</sup>). Regulacija funkcije EAAT je složena i uključuje veći broj različitih mehanizama (fosforilacija, rad drugih transportnih molekula koji menjaju elektrohemijske gradijente jona i dr.). Zbog moguće patofiziološke uloge u procesima ekscitotoksičnosti EAAT privlače veliku pažnju mnogih istraživača, ali i farmaceutskih kompanija.

### Glutamat, centralni nervni sistem, periferni nervi i čula

Glutamat je so jedne od najzastupljenijih aminokiselina, neurotransmitera u mozgu. Najveća koncentracija glutamatergičkih sinapsi i GluR u CNS sisara se nalazi u hipokampusu, cerebralnom korteksu, strijatumu, a potom u talamusu, kori malog mozga, olfaktornom bulbusu, amigdali i



Sl. 5 – Model topologije EAAT. Prema Masson et al. (38)

sivoj masi kičmene moždine. Brojne su aferentne i eferentne glutamatergičke projekcije, uključujući skoro sve velike eferentne sisteme kore velikog mozga, kao i mnoge projekcije neurone. Najviše proučavane centralne uloge glutamata su u procesima nervnog razvoja, plastičnosti nervnog sistema i fenomenima elektrofiziološke i morfološke konsolidacije sinapsi za koje se veruje da su povezani sa učenjem i memorijom (3, 18).

Ekscitotoksičnost glutamata se javlja zbog prolongirane stimulacije GluR kada se glutamat nekontrolisano oslobađa iz oštećenih neurona. To se događa kod raznih patoloških stanja kao što su trauma, ishemijski moždani insulti, metabolički poremećaji (hipoksija, hipoglikemija) i neka trovanja. Veruje se da su i neke neurodegenerativne bolesti (Alchajmerova demencija, Parkinsonova bolest, amiotrofička lateralna skleroza i dr.), bar delom, uslovljene štetnom aktivacijom glutamatergičkih mehanizama (19). Brojna istraživanja su usmerena na ulogu glutamata u konvulzivnoj, odn. epileptičkoj aktivnosti mozga, a neki od postojećih antiepileptika delom utiču i na glutamatergičke mehanizme (13). U manjoj ili većoj meri glutamat učestvuje u regulaciji motorne aktivnosti, a takođe se veruje da je uključen i u pojedina autoimunska oštećenja mozga (20), kao i u nastanak psihijatrijskih poremećaja i zavisnosti od psihoaktivnih supstanci (21). Glutamat je jedan od veoma važnih nociceptivnih neurotransmitera jer su glutamatergičke sinapse bogato zastupljene u centralnim nociceptivnim putevima, posebno u kičmenoj moždini (22). Sem toga, GluR se nalaze u perifernim nervima, a njihova aktivacija je povezana sa inflamacijom i nocicepcijom (23), što sve može imati značaja za buduće lečenje

kod nekih bolnih sindroma (alodinija, hiperalgezija). Glutamat i drugi elementi glutamatergičke sinapse su bogato zastupljeni u skoro svim čulima kao što su auditorni i vestibularni sistem i, posebno, retina (24). Karakteristični, pikantni ukus hrane i začina bogatih slobodnim aminokiselinama, nazvan umami (reč preuzeta iz japanskog jezika), potiče od percepcije mononatrijum L-glutamata (MSG) u hrani. Specifični receptori za ovu supstancu u gustatornim papilama su, verovatno, NMDA receptori i jedna izoforma mGluR<sub>4</sub>, a percepcija umami ukusa u kori velikog mozga je povezana sa mnogim bihevioralnim aspektima ishrane (25). Inače, prehrambenim industrijskim proizvodima se, kao aditiv, obilato dodaje natrijum glutamat (MSG) radi po-

boljšanja organoleptičkih osobina. Olfaktorne sinapse takođe koriste glutamat kao neurotransmiter (26).

#### Glutamat, vegetativni nervni sistem i periferna tkiva

Glutamat i njegovi receptori se nalaze u mnogim vegetativnim centrima u CNS-u, ali i u perifernim delovima vegetativnog nervnog sistema (nervna vlakna i ganglijske ćelije) i visceralnim organima. Glutamat i GluR su široko zastupljeni u mnogim strukturama moždanog stabla koje potpuno ili delom pripadaju vegetativnim centrima kao što su *nucleus tractus solitarii* i rostralna ventrolateralna medula (27). Neke od vegetativnih funkcija koje su pod značajnim glutamatergičkim uticajem su: kardiovaskularne i respiratorne, potom regulacija apetita i ishrane (28), cirkadijalnog ritma (29), sekrecije GnRH (30) i sinteze melatonina (31), kao i centralna kontrola motiliteta visceralnih organa. Na perifernim vlaknima simpatikusa nalaze se glutamat i iGluR, a iGluR i mGluR se, takođe, nalaze u sru (32).

Glutamat je verovatni neurotransmiter i u enteričkom nervnom sistemu (33, 34). On može, pod određenim uslovima, da kontrahuje animalne i humane digestivne glatke mišiće dvojnim mehanizmom, direktno, stimulacijom GluR na samim glatkim mišićnim ćelijama i, indirektno, putem oslobađanja drugih ekscitatornih neurotransmitera mienteričkih plexusa (35, 36), ali pravi značaj ovog dejstva glutamata još uvek nije sasvim poznat.

Receptori za glutamat i EAAT su odnedavno otkriveni i u mnogim perifernim tkivima i ćelijama kao što su:

ćelije koštanog tkiva, keratinociti i druge ćelije kože, endokrine ćelije pankreasa, te mastociti, trombociti, megakariociti, hepatociti i druge ćelije (37). Zbog svega toga se opravdano veruje da glutamat može igrati ulogu važnog signalnog molekula ne samo u nervnom sistemu već i na periferiji, bilo da deluje kao neurotransmiter ili neuromodulator, odn. parakini ili autokrini faktor.

### Zahvalnost

Rad je delom finansiran sredstvima naučnoistraživačkog projekta Ministarstva za nauku i tehnologiju Republike Srbije.

### L I T E R A T U R A

1. *Hayashi T.* A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. *Jpn J Physiol* 1952; 3: 46–64.
2. *Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW.* The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1989; 29: 365–402.
3. *Hollmann M, O'Shea-Greenfield A, Rogers SW, Heinemann S.* Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature* 1989; 342(6250): 643–8.
4. *Houamed KM, Kuijper JL, Gilbert TL, Haldeman BA, O'Hara PJ, Mulvihill ER, et al.* Cloning, expression and gene structure of a G protein-coupled glutamate receptor from rat brain. *Science* 1991; 252(5010): 1318–21.
5. *Masu M, Tanabe Y, Tsuchida K, Shigemoto R, Nakanishi S.* Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* 1991; 349(6312): 760–5.
6. *Torgner I, Kvamme E.* Synthesis of transmitter glutamate and the glial-neuron interrelationship. *Mol Chem Neurobiol* 1990; 12(1): 11–7.
7. *Baethmann A, Maier-Hauff K, Kempfski O, Unterberg A, Wahl M, Schurer L.* Mediators of brain edema and secondary brain damage. *Crit Care Med* 1988; 16(10): 972–8.
8. *Fykse EM, Fonnum F.* Amino acid neurotransmission: dynamics of vesicular uptake. *Neurochem Res* 1996; 21(9): 1053–60.
9. *Bergles DE, Diamond JS, Jahr CE.* Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Curr Opin Neurobiol* 1999; 9(3): 293–8.
10. *Seal RP, Amara SG.* Excitatory amino acid transporters: a family in flux. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 431–56.
11. *Conti F, Weinberg RJ.* Shaping excitation at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci* 1999; 22(10): 451–8.
12. *van Rossum D, Hanisch UK.* Cytoskeletal dynamics in dendritic spines: direct modulation by glutamate receptors? *Trends Neurosci* 1999; 22(7): 290–5.
13. *Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K.* Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 1998; 54(5): 581–618.
14. *Cleland TA.* Inhibitory glutamate receptor channels. *Mol Neurobiol* 1996; 13(2): 97–136.
15. *Ziff EB.* Recent excitement in the ionotropic glutamate receptor field. *Ann NY Acad Sci* 1999; 868: 465–73.
16. *Conn PJ, Pin JP.* Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 205–37.
17. *Lehre KP, Danbolt NC.* The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J Neurosci* 1998; 18(21): 8751–7.
18. *Collingridge GL, Singer W.* Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11(7): 290–6.
19. *Blandini F, Greenamyre JT.* Prospects of glutamate antagonists in the therapy of Parkinson's disease. *Fundam Clin Pharmacol* 1998; 12(1): 4–12.
20. *Sillevis Smitt P, Kinoshita A, De Leeuw B, Moll W, Coesmans M, Jaarsma D, et al.* Paraneoplastic cerebellar ataxia due to autoantibodies against a glutamate receptor. *N Engl J Med* 2000; 342(1): 21–7.
21. *Tamminga C.* Glutamatergic aspects of schizophrenia. *Br J Psychiatry Suppl* 1999; (37): 12–5.
22. *Furst S.* Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res Bull* 1999; 48(2): 129–41.
23. *Coggeshall RE, Carlton SM.* Evidence for an inflammation-induced change in the local glutamatergic regulation of postganglionic sympathetic efferents. *Pain* 1999; 83(2): 163–8.
24. *Brandstatter JH, Koulen P, Wassle H.* Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina. *Vision Res* 1998; 38(10): 1385–97.
25. *Chaudhari N, Landin AM, Roper SD.* A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor. *Nat Neurosci* 2000; 3(2): 113–9.
26. *Jia C, Chen WR, Shepherd GM.* Synaptic organization and neurotransmitters in the rat accessory olfactory bulb. *J Neurophysiol* 1999; 81(1): 345–55.
27. *Niwa M, Taniyama K.* Central autonomic mechanism and neurotransmitters. *Nippon Rinsho* 1992; 50(4): 680–5.
28. *Khan AM, Curras MC, Dao J, Jamal FA, Turkowski CA, Goel RK, et al.* Lateral hypothalamic NMDA receptor subunits NR2A and/or NR2B mediate eating: immunochemical/behavioral evidence. *Am J Physiol* 1999; 276 (3 Pt 2): R880–91.
29. *Chambille I.* Circadian rhythm of AMPA receptor GluR2/3 subunit-immunoreactivity in the suprachias-

- matic nuclei of Syrian hamster and effect of a light-dark cycle. *Brain Res* 1999; 833(1): 27–38.
30. *Eyigor O, Jennes L.* Kainate receptor subunit-positive gonadotropin-releasing hormone neurons express c-Fos during the steroid-induced luteinizing hormone surge in the female rat. *Endocrinology* 2000; 141(2): 779–86.
31. *Ishio S, Yamada H, Craft CM, Moriyama Y.* Hydroxyindole-O-methyltransferase is another target for L-glutamate-evoked inhibition of melatonin synthesis in rat pinealocytes. *Brain Res* 1999; 850(1–2): 73–8.
32. *Gill SS, Pulido OM, Mueller RW, McGuire PF.* Immunohistochemical localization of the metabotropic glutamate receptors in the rat heart. *Brain Res Bull* 1999; 48(2): 143–6.
33. *Kirchgessner AL.* Glutamate in the enteric nervous system. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1(6): 591–6.
34. *Hu HZ, Ren J, Liu S, Gao C, Xia Y, Wood JD.* Functional group I metabotropic glutamate receptors in submucous plexus of guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol* 1999; 128(8): 1631–5.
35. *Janković SM, Milovanović D, Matović M, Irić-Čupić V.* The effects of excitatory amino acids on isolated gut segments of the rat. *Pharmacol Res* 1999; 39(2): 143–8.
36. *Milovanović DR.* Effects of excitatory aminoacids on smooth muscles of digestive tract [dissertation]. Kragujevac: Medicinski fakultet Univerziteta u Kragujevcu; 2001. (in Serbian)
37. *Skerry TM, Genever PG.* Glutamate signalling in non-neuronal tissues. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22(4): 174–81.
38. *Masson J, Sagne C, Hamon M, Mestikawy S.* Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 1999; 51(3): 439–64.
- Rad je primljen 12. VI 2002. god.