

# ВПЛИВ NO-711 І $\beta$ -АЛАНІНУ НА НАКОПИЧЕННЯ ГЛУТАМАТУ ТА $\gamma$ -АМІНОМАСЛЯНОЇ КИСЛОТИ НЕРВОВИМИ ТЕРМІНАЛЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ ПІСЛЯ ПЕРИНАТАЛЬНОЇ ГІПОКСІЇ

М. В. Дударенко  
Л. М. Яценко  
М. В. Піскова  
А. Г. Назарова  
О. О. Воронова  
А. О. Пастухов  
Н. Г. Позднякова

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна  
НАН України, Київ

E-mail: natapoz@biochem.kiev.ua

Отримано 02.07.2015

Метою дослідження було проаналізувати ефекти високоселективного блокатора транспортерів  $\gamma$ -аміномасляної кислоти GAT1-типу, NO-711 і субстратного інгібітора транспортерів  $\gamma$ -аміномасляної кислоти GAT3-типу  $\beta$ -аланіну на початкову швидкість накопичення L-[ $^{14}$ C]глутамату і [ $^3$ H]- $\gamma$ -аміномасляної кислоти нервовими терміналями (синаптосомами) кори, гіпокампа і таламуса головного мозку щурів у нормі та після перинатальної гіпоксії.

Стан перинатальної гіпоксії моделювали, тримаючи 10–12-добових щурів у герметичній камері, де атмосфера складалася з 4% кисню і 96% азоту. В експеримент брали тварин за 8–9 тижнів після того, як вони зазнали впливу гіпоксії, та контрольних такого самого віку. NO-711 (30 мкМ) і  $\beta$ -аланін (100 мкМ) не впливали на початкову швидкість накопичення L-[ $^{14}$ C]глутамату синаптосомами кори, гіпокампа і таламуса. У синаптосомах кори NO-711 та  $\beta$ -аланін знижували початкову швидкість накопичення [ $^3$ H]- $\gamma$ -аміномасляної кислоти, але ефективність їх інгібуючої дії не змінювалась після перинатальної гіпоксії порівняно з контролем. У синаптосомах гіпокампа і таламуса ефективність дії  $\beta$ -аланіну підвищувалась унаслідок впливу перинатальної гіпоксії, тоді як ефективність дії NO-711 — зменшувалась. Одержані результати свідчать про зміни у співвідношенні активних транспортерів ГАМК — GAT1 і GAT3, експресованих на плазматичній мембрані нервових закінчень після перинатальної гіпоксії. Отже,  $\beta$ -аланін є перспективною речовиною для розроблення нейротропних фармакологічних препаратів, спрямованих на транспортеропосередковану регуляцію ГАМК-ергічної нейротрансмісії.

**Ключові слова:** перинатальна гіпоксія, високоафінні специфічні мембранні ГАМК-транспортери, NO-711,  $\beta$ -аланін.

Розвиток нейропатологій унаслідок перинатальної гіпоксії є результатом порушення балансу між процесами збудження і гальмування, ключову роль у підтриманні якого відіграє ГАМК-ергічна система. Глутамат та  $\gamma$ -аміномасляна кислота (ГАМК) у центральній нервовій системі ссавців є основними збуджувальним та гальмівним медіаторами відповідно, які беруть участь у здійсненні більшості функцій головного мозку, зокрема розпізнавання, пам'яті, навчання. Баланс між процесами збудження і гальмування є ключовим чинником нормального функціонування ЦНС. Глутамат та ГАМК реалізують свою сигнальну функцію, діючи на ре-

цептори, розташовані на поверхні клітин, що їх експресують. Тому концентрація цих нейромедіаторів у позаклітинному середовищі визначає ступінь стимуляції рецепторів. Україй важливо, аби позаклітинна концентрація нейромедіаторів підтримувалась на низькому рівні. Низький позаклітинний рівень нейромедіаторів може підтримуватися лише за допомогою транспортування їх у клітину, оскільки метаболізм цих сполук не відбувається в позаклітинному середовищі. Порушення транспортування глутамату та ГАМК є характерною рисою патогенезу майже всіх неврологічних захворювань [1–10].

Перинатальна гіпоксія призводить до хронічних неврологічних розладів, таких як затримка розумового розвитку, порушення когнітивних властивостей, відхилення у поведінці й навіть до епілепсії [11]. Схильність до судомної активності внаслідок перинатальної гіпоксії є результатом саме порушення балансу між процесами збудження і гальмування. Численними спостереженнями *in vivo* встановлено, що короткочасний гіпоксичний стан у перинатальному періоді зумовлює гостре та хронічне збудження в гіпокампі й таламусі за відсутності значної гістопатології [12–14]. Для визначення механізмів віддалених наслідків перинатальної гіпоксії велике значення мають модельні дослідження на тваринах. Показано, що мозок народженого вчасно щура перебуває в незрілому стані, і за рівнем розвитку мозку 8–10-добові щури відповідають народженій вчасно дитині. Доведено також, що другий постнатальний тиждень у щурів є періодом підвищеної збудливості та чутливості до епілептогенних стимулів [15].

У патофізіології епілепсії гальмівна ГАМК-ергічна система відіграє ключову роль у контролі нейрональної збудливості та підтриманні балансу між процесами гальмування і збудження. Сполуки, що впливають на процес гальмування, найчастіше входять до арсеналу протисудомних медичних препаратів, а дія ефективних антиконвульсантів найчастіше зумовлена впливом на функціонування транспортерів ГАМК, унаслідок чого підвищується рівень позаклітинної ГАМК [16–18].

Систему транспорту ГАМК охарактеризовано як *in vivo*, так і на зрізах мозку, культурах нейрональних клітин та синапсоматах. Клоновано чотири типи переносників ГАМК (GAT1, GAT2, GAT3, GAT4), які відрізняються за локалізацією, афінністю до ГАМК та чутливістю до інгібіторів [3, 19, 20]. Домінуючими типами, що експресуються в нейрональних клітинах, є GAT1 і GAT3. Саме ці транспортери розглядають як основні регулятори концентрації позаклітинної ГАМК у мозку. Максимальна дія специфічного інгібітора GAT1, тіагабіну, виявляється на препаратах кори головного мозку і гіпокампа, що дає підстави вважати GAT1 домінантним типом транспортерів у цих структурах. Набагато менш ефективною є дія тіагабіну в таламусі. Існує точка зору, що ГАМК-ергічним нейронам таламусу взагалі не притаманна високоафінна система зворотного накопичення ГАМК [21]. Транспортери ГАМК можуть бути заблоковані високоселективним інгібітором NO-711 [1,2,5,6-Tetrahydro-

1-(2-diphenylmethylene-amino-oxy-ethyl)-3-pyridinecarboxylic acid hydrochloride], що має  $IC_{50}$  0,38  $\mu$ M для GAT1-типу;  $IC_{50}$  729  $\mu$ M — для GAT2-типу та  $IC_{50}$  349  $\mu$ M — для GAT3-типу [3, 22].

Слід зазначити, що одночасне використання інгібіторів до різних типів транспортерів ГАМК має значно ширший спектр протисудомної дії, ніж сполук, які мають спорідненість тільки до транспортерів GAT1-типу. На сьогодні інгібітори транспортерів ГАМК, які не належать до GAT1-типу, вважають перспективними як потенційні терапевтичні препарати для лікування епілепсії [19, 23]. Окрім того, фізіологічну роль транспортерів ГАМК, які не належать до GAT1-типу, не з'ясовано, і тому їх інгібітори також можуть бути використані як фармакологічні засоби для досліджень біологічної ролі цих транспортерів [24]. Таким чином, існує нагальна потреба в аналізі інгібіторів транспортерів ГАМК, які можна застосовувати як інструменти або як потенційні лікарські засоби [25].

Відомо, що  $\beta$ -аланін є субстратним інгібітором транспортерів ГАМК GAT3-типу, а його структура — проміжною між  $\alpha$ -амінокислотами (гліцином, глутаматом) і  $\gamma$ -амінокислотами (ГАМК). Екзогенний  $\beta$ -аланін здатен проходити через гематоенцефалічний бар'єр до центральної нервової системи (ЦНС) через тауринчутливі транспортери  $\beta$ -амінокислот.  $\beta$ -Аланін широко представлений у мозку в концентрації від 0,03 до 0,08 мМ [26]. Встановлено, що в ЦНС  $\beta$ -аланін зв'язується з обома рецепторами гліцину — стрихнінчутливим та стрихніннечутливим. Показано, що  $\beta$ -аланін активує стрихнінчутливий рецептор гліцину і допомагає модулювати збудження нейронів [27].  $\beta$ -Аланін здатен інгібувати зв'язування гліцину з його сайтом на N-метил-D-аспартат (NMDA)-рецепторі [28]. Відомо, що глутаматні рецептори NMDA-типу локалізовані на нервових терміналях гіпокампа та кори головного мозку, мають сайти зв'язування для глутамату та гліцину і залучені до регуляції ГАМК-ергічної нейротрансмісії [29].

Метою нашого дослідження було проаналізувати вплив NO-711, високоселективного блокатора GAT1, та  $\beta$ -аланіну, субстратного інгібітора GAT3, на початкову швидкість накопичення [ $^3$ H]-ГАМК нервовими терміналями (синапсоматами) кори, гіпокампа і таламуса, ізольованими з головного мозку щурів. Враховуючи можливість впливу  $\beta$ -аланіну на глутаматергічну нейротрансмісію, було також досліджено вплив NO-711 та  $\beta$ -аланіну на накопичення L-[ $^{14}$ C]-глутамату синапто-

сомами. Тварин 10–12-денного віку піддавали впливу глобальної гіпоксії до появи тоніко-клонічних судом. В експеримент брали щурів через 8–9 тижнів (період досягнення статевої зрілості) після того, як вони зазнали впливу гіпоксії, і контрольних такого самого віку.

## Матеріали і методи

### Матеріали

У роботі було використано такі матеріали та реактиви: HEPES, (N-2-hydroxyethylpiperazine-n-2-ethanesulfonic acid), Fluka (Швейцарія); EDTA, Calbiochem (США);  $\beta$ -аланін, фікол-400, амінооксіоцтова кислота, NO-711, фільтри GF/C Whatman, Sigma (США); [ $^3\text{H}$ ]-ГАМК, Perkin Elmer (США); L-[ $^{14}\text{C}$ ]-глутамат, сцинтиляційні рідини OCS, ACS Amersham (Велика Британія); інші реактиви категорії х. ч. та о. с. ч. були вітчизняного виробництва («Реахім», Україна).

### Етичні норми

Усі експерименти було виконано згідно з «Правилами проведення робіт з використанням експериментальних тварин», затвердженими Комісією з догляду, утримання й використання експериментальних тварин Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (Протокол №1 від 19/09-2012).

Дослідження проводили на білих щурах-самцях Wistar, яких було розділено на дві групи: контрольну ( $n = 12$ ) та експериментальну ( $n = 12$ ). Також 6 контрольних тварин використано для аналізу залежності ефектів інгібування від часу. Щурів утримували на стандартному раціоні віварію.

### Моделювання стану перинатальної гіпоксії

Для створення стану перинатальної гіпоксії використовували модель [12], що імітує гострі судоми й хронічний епілептогенний ефект гіпоксії у немовлят, який спостерігається у клініці. Експериментальних тварин 10–12-денного віку утримували протягом 12 хв у камері, де повітряну атмосферу заміщали газовою сумішшю, що складалася з 3–4% кисню і 96% азоту, до появи у тварин тоніко-клонічних судом. Через 8 тижнів після впливу гіпоксії тварин брали в експеримент. Вік тварин відповідав періоду досягнення ними статевої зрілості.

### Виділення очищеної фракції синапсом із головного мозку щурів

Синаптосоми виділяли за методом Котмана [30] із незначними модифікаціями [31, 32]. У декапітованих тварин брали великі

півкулі головного мозку, відокремлюючи стовбурову частину та мозочок. Моторну зону кори, гіпокамп і таламус швидко виділяли під мікроскопом. Для отримання фракції синапсом готували 20%-й гомогенат, використовуючи скляний гомогенізатор Поттера (зазор 0,2 мм). Середовище виділення містило 0,32 М сахарози, 5 мМ HEPES-NaOH pH 7,4, 0,2 мМ EDTA. Гомогенат центрифугували при 2 500 g 5 хв для відокремлення ядер, кровоносних судин, зруйнованих нервових клітин. Надосадову фракцію центрифугували при 15 000 g протягом 12 хв, осаджуючи фракцію неочищених синапсом — P2-фракцію. Для одержання очищеної фракції синапсом попередній осад ресуспендували у середовищі виділення та наносили на градієнт фіколу, який містив 13%-, 6% і 4%-й фікол, приготований на середовищі виділення, і центрифугували при 70 000 g 45 хв на бакет-роторі. Фракцію синапсом, що її отримували в інтерфазі між 13%- і 6%-м розчинами фіколу, збирали, розводили середовищем виділення 1:4 і центрифугували при 15 000 g 20 хв. Одержаний осад суспендували в стандартному сольовому розчині, який містив (мМ): NaCl — 126,0; KCl — 5,0; CaCl<sub>2</sub> — 2,0; MgCl<sub>2</sub>, — 1,4; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, — 1,0; HEPES-NaOH — 20,0, pH 7,4; D-glucose — 10,0. Всі операції проводили за 0–4 °C. Усі розчини, які використовували в операціях виділення синапсом та для подальшого дослідження процесів вивільнення нейромедіатора, постійно насичували киснем. Концентрацію протеїну визначали за методом Ларсона [33].

### Визначення накопичення [ $^3\text{H}$ ]-ГАМК синаптосомами

У дослідях з акумуляції [ $^3\text{H}$ ]-ГАМК синаптосомами стандартний сольовий розчин містив 100 мкМ амінооксіоцтової кислоти, інгібітора ГАМК-трансамінази, для запобігання утворення метаболітів ГАМК. Концентрація протеїну синапсом у пробі дорівнювала 200 мкг/мл, об'єм проби — 0,6 мл. Синаптосоми інкубували за 37 °C 15 хв без інгібіторів (контроль) чи з додаванням 30 мкМ NO-711 або 100 мкМ  $\beta$ -аланіну, після чого ініціювали процес акумуляції внесенням суміші ГАМК (1 мкМ ГАМК та 50 нМ — 0,2 мкКі/мл [ $^3\text{H}$ ]-ГАМК). Через 1 хв аліквоти (0,5мл) фільтрували через GF/C-фільтри. Фільтри двічі промивали охолодженим стандартним сольовим розчином, висушували та вимірювали рівень радіоактивності у сцинтиляційній рідині OCS у лічильнику Delta 300 (Tracor Analytic, США) [34, 35].

### *Визначення накопичення L-[<sup>14</sup>C]-глутамату синапсосомами*

Накопичення L-[<sup>14</sup>C]-глутамату синапсосомами визначали так: зразки суспензії (125 мкл) з концентрацією протеїну 250 мкг/мл преінкубували в стандартному сольовому розчині за 37 °C 15 хв без інгібіторів (контроль) чи з додаванням 30 мкМ NO-711 або 100 мкМ β-аланіну. Після цього ініціювали процес накопичення додаванням суміші L-глутамату та L-[<sup>14</sup>C]-глутамату (10 мкМ L-глутамату і 420 нМ — 0,1 мкКі/мл L-[<sup>14</sup>C]-глутамату) та інкубували за 37 °C. Аліквоти відбирали через 0–10 хв, потім швидко осаджували в мікроцентрифузі Eppendorf (20 с при 10 000 g). Накопичення визначали в аліквотах надосаду (100 мкл) та солубілізованого в SDS осаду в сцинтиляційній рідині ACS (aqueous counting scintillate — сцинтиляційна рідина для водних зразків) у лічильнику Delta 300 (Tracor Analytic, США) [36].

### *Математична обробка даних*

Імовірність результатів дослідження встановлювали за критерієм Стьюдента. Вірогідність помилкових прогнозів *P* становила < 0,05.

Статистичну обробку даних, побудову графіків і розрахунки функцій здійснювали із застосуванням програми Excel.

## **Результати та обговорення**

*Вплив NO-711 та β-аланіну на високоафінне транспортеропосередковане накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК та L-[<sup>14</sup>C]-глутамату нервовими терміналями кори головного мозку.*

Вплив NO-711 та β-аланіну на високоафінне транспортеропосередковане накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК досліджували на ізольованих нервових терміналях — синапсосомах, виділених із головного мозку щурів. Синапсосоми зберігають усі властивості інтактного нервового закінчення щодо забезпечення процесу передачі нервового імпульсу, а саме здатність накопичувати та вивільнювати нейромедіатори, підтримувати мембранний потенціал та функціональний стан синаптичних везикул. Синапсосоми вважають однією з найкращих систем для дослідження взаємозв'язку між структурою протеїнів, їхніми біохімічними та фізіологічними функціями [37].

У першій серії експериментів ми з'ясували, як час інкубації синапсосом з інгібіторами впливає на накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК. Було проведено порівняльний аналіз «гострих» ефектів інгібіторів ГАМК-транспортерів на швидкість накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК

та їхніх ефектів після попередньої інкубації із синапсосомами протягом 15 хв. Під час дослідження «гострих» ефектів інгібітори додавали в середовище інкубації одночасно з [<sup>3</sup>H]-ГАМК, яка ініціює початок процесу накопичення нейромедіатора. За початкову швидкість вважали накопичення нейромедіаторів синапсосомами за 1 хв.

На синапсосомах кори головного мозку було показано, що «гострий» ефект високоселективного блокатора транспортерів ГАМК GAT1-типу NO-711 (30 мкМ) був такий самий, як і ефект після його попередньої інкубації із синапсосомами протягом 15 хв. NO-711 знижував накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК синапсосомами за 5 хв на 94,3% у разі одночасного додавання з [<sup>3</sup>H]-ГАМК та на 93,6% після попередньої інкубації (рис. 1, А). На рис. 1, Б показано накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК синапсосомами під впливом субстратного інгібітора транспортерів ГАМК GAT3-типу β-аланіну (100 мкМ). З додаванням β-аланіну одночасно з [<sup>3</sup>H]-ГАМК до середовища інкубації спостерігали незначне зниження початкової швидкості накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК синапсосомами та її акумуляції за 5 хв — на 3% та 6,3% відповідно. Однак після попередньої інкубації синапсосом з β-аланіном протягом 15 хв відбувалося зниження початкової швидкості накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК на 14,1%, а за 5 хв — на 21,4%. Отже, після попередньої інкубації інгібіторний ефект β-аланіну посилювався. Аналогічну залежність інгібіторного ефекту NO-711 та β-аланіну від часу інкубації спостерігали і в експериментах на синапсосомах таламуса та гіпокампа.

У наступних експериментах було проаналізовано вплив NO-711 і β-аланіну на початкову швидкість накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК синапсосомами кори головного мозку щурів через 8–9 тижнів після перинатальної гіпоксії та контрольних такого самого віку. Протокол експериментів з інгібіторами включав попередню інкубацію синапсосом з 30 мкМ NO-711 або зі 100 мкМ β-аланіном протягом 15 хв.

Дослідження накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК нервовими терміналями кори головного мозку щурів контрольної групи виявили, що початкова швидкість накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК під впливом NO-711 знижувалась на 80,1% — зі  $150,2 \pm 2,4$  пмоль/хв·мг протеїну до  $29,3 \pm 3,9$  пмоль/хв·мг протеїну (рис. 2). Початкова швидкість накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК синапсосомами кори щурів, які зазнали перинатальної гіпоксії, становила  $140,8 \pm 1,9$  пмоль/хв·мг протеїну. У присутності NO-711 початкова швидкість накопи-

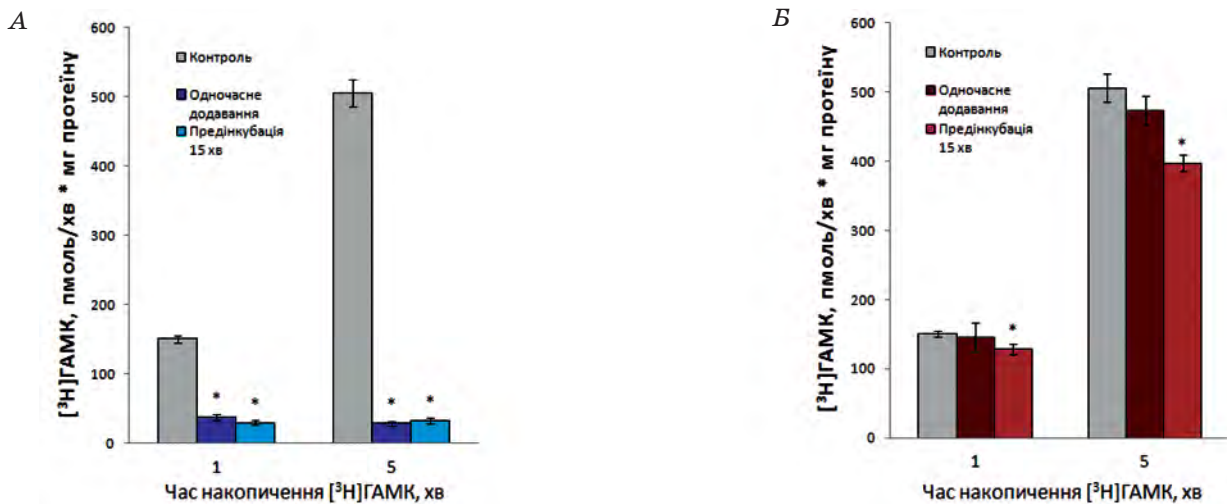


Рис. 1. Накопичення [3H]-ГАМК синапсосомами кори головного мозку щурів під дією: 30 мкМ NO-711 (А) та 100 мкМ β-аланіну (Б)

Тут і далі: \*  $P \leq 0,05$  відносно контролю,  $n = 6$ .

чення [3H]-ГАМК знижувалась на 78,2% і становила  $30,7 \pm 2,1$  пмоль/хв·мг протеїну. Таким чином, вплив NO-711 на накопичення [3H]-ГАМК синапсосомами кори контрольних тварин і тих, які зазнали впливу гіпоксії, був подібним.

Під впливом β-аланіну (рис. 2) початкова швидкість накопичення [3H]-ГАМК синапсосомами кори головного мозку контрольних щурів знижувалась на 14,1% і становила  $129,1 \pm 3,8$  пмоль/хв·мг протеїну. У щурів, які зазнали умов гіпоксії, початкова швидкість накопичення [3H]-ГАМК синапсосомами кори в присутності β-аланіну знижувалась на 15,1% і дорівнювала  $120,0 \pm 3,1$  пмоль/хв·мг протеїну. Таким чином, ефективність дії β-аланіну суттєво не змінювалась у тварин, які зазнали перинатальної гіпоксії.

У наступних експериментах аналізували вплив NO-711 і β-аланіну на початкову швидкість накопичення L-[14C]-глутамату синапсосомами кори головного мозку щурів. Протокол експериментів з інгібіторами включав попередню інкубацію синапсосом з 30 мкМ NO-711 або зі 100 мкМ β-аланіном протягом 15 хв.

Дослідження накопичення L-[14C]-глутамату нервовими терміналями кори головного мозку щурів контрольної групи виявили, що початкова швидкість накопичення L-[14C]-глутамату під впливом NO-711 та β-аланіну не змінювалась і становила у контролі  $2,9 \pm 0,25$  нмоль/хв·мг протеїну, за присутності NO-711 —  $2,75 \pm 0,3$  нмоль/хв·мг протеїну, а β-аланіну —  $2,6 \pm 0,4$  нмоль/хв·мг протеїну. Накопичення L-[14C]-глутамату синапсосомами за 10 хв також залишалось незмінним і становило  $9,5 \pm 0,4$  нмоль/хв·мг протеїну

в контролі,  $9,3 \pm 0,3$  нмоль/хв·мг — у присутності NO-711 та  $9,2 \pm 0,5$  нмоль/хв·мг — β-аланіну (рис. 3).

У тварин, що зазнали впливу перинатальної гіпоксії, також не було виявлено впливу NO-711 і β-аланіну на початкову швидкість та накопичення за 10 хв L-[14C]-глутамату нервовими терміналями кори головного мозку.

*Ефект NO-711 та β-аланіну на накопичення [3H]-ГАМК і L-[14C]-глутамату нервовими терміналями гіпокампа*

У синапсосомах гіпокампа (рис. 4) NO-711 знижував початкову швидкість накопичення [3H]-ГАМК на 84,3% — зі  $178,6 \pm 2,8$  пмоль/хв·мг протеїну в контролі до  $28,0 \pm 1,1$  пмоль/хв·мг — у присутності 30 мкМ NO-711.

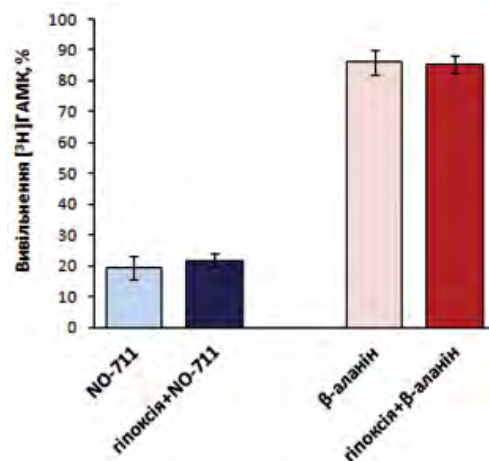


Рис. 2. Початкова швидкість накопичення [3H]-ГАМК синапсосомами кори головного мозку щурів під впливом 30 мкМ NO-711 та 100 мкМ β-аланіну:

за 100% прийнято початкову швидкість накопичення [3H]-ГАМК без додавання інгібіторів

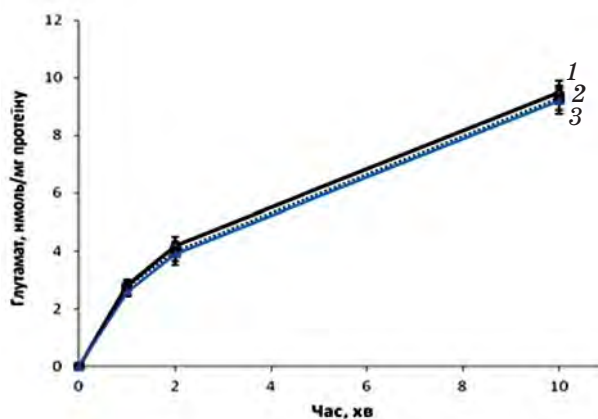


Рис. 3. Накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату синапсами кори головного мозку: у контролі (1), у присутності 30 мкМ NO-711 (2) та 100 мкМ β-аланіну (3)

У гіпокампі щурів, які зазнали умов гіпоксії в ранньому віці, початкова швидкість накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК синапсами становила  $167,7 \pm 2,1$  пмоль/хв·мг протеїну. Інкубація синапсом з 30 мкМ NO-711 призводила до зниження швидкості накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК на 80,1% — до  $32,6 \pm 1,2$  пмоль/хв·мг протеїну. Таким чином, ефективність впливу NO-711 на початкову швидкість накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК синапсами гіпокампа знижувалась у тварин, що зазнали перинатальної гіпоксії порівняно з контрольними.

За умов присутності 100 мкМ β-аланіну (рис. 4) початкова швидкість накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК синапсами гіпокампа контрольних щурів знижувалась на 14,4% і становила  $152,9 \pm 4,3$  пмоль/хв·мг протеїну. У щурів, які зазнали впливу гіпоксії, початкова швидкість накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК синапсами гіпокампа в присутності β-аланіну знижувалась на 22,1% і становила  $130,7 \pm 3,2$  пмоль/хв·мг протеїну. Отже, ефект β-аланіну посилювався у нервових закінченнях гіпокампа тих тварин, які зазнали перинатальної гіпоксії.

Подальші експерименти на синапсах гіпокампа не виявили впливу NO-711 і β-аланіну на початкову швидкість накопичення та накопичення за 10 хв L-[<sup>14</sup>C]-глутамату. У тварин, що зазнали впливу перинатальної гіпоксії, також не виявлено впливу NO-711 і β-аланіну на початкову швидкість накопичення та накопичення за 10 хв L-[<sup>14</sup>C]-глутамату в синапсах гіпокампа.

*Ефект NO-711 та β-аланіну на накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК і L-[<sup>14</sup>C]-глутамату нервовими терміналами таламуса*

У нервових терміналах таламуса контрольних щурів NO-711 знижував початкову швидкість накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК на 79,6% — зі  $142,4 \pm 4,8$  пмоль/хв·мг протеїну до  $29,0 \pm 2,1$  пмоль/хв·мг (рис. 5). Початкова швидкість накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК синапсами таламуса щурів, які зазнали впливу гіпоксії, під дією 30 мкМ NO-711 знижувалась на 70,9% — зі  $143,5 \pm 4,2$  пмоль/хв·мг протеїну до  $41,8 \pm 3,4$  пмоль/хв·мг. Таким чином, ефективність впливу NO-711 зменшувалась у нервових закінченнях таламуса тварин, що зазнали перинатальної гіпоксії, порівняно з контрольними.

За умов 15-хвилинної попередньої інкубації синапсом таламуса контрольних щурів зі 100 мкМ β-аланіном (рис. 5) початкова швидкість накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК знижувалась на 20,2% і становила  $113,6 \pm 3,3$  пмоль/хв·мг протеїну. У щурів, що зазнали перинатальної гіпоксії, β-аланін спричинював зниження початкової швидкості накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК синапсами таламуса на 30,2% — до  $100,1 \pm 2,5$  пмоль/хв·мг протеїну. Отже, вплив β-аланіну посилювався у нервових закінченнях таламуса щурів, які зазнали умов гіпоксії в ранньому віці.

Не було виявлено впливу NO-711 і β-аланіну на початкову швидкість накопичення та накопичення за 10 хв L-[<sup>14</sup>C]-глутамату синапсами таламуса контрольних тварин і тварин, що зазнали впливу перинатальної гіпоксії.

ГАМК є першим функціональним нейромедіатором у мозку, який розвивається, де він

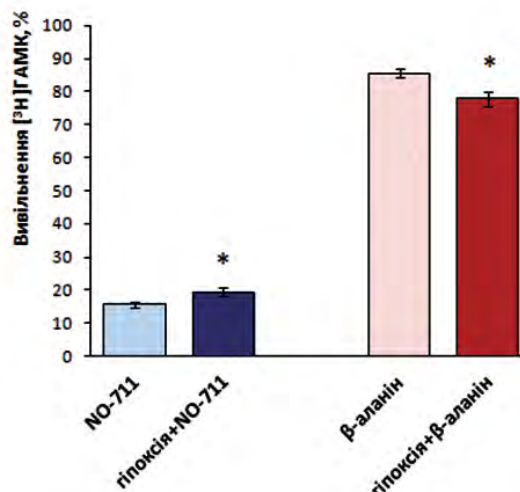


Рис. 4. Початкова швидкість накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК синапсами гіпокампа щурів під впливом 30 мкМ NO-711 та 100 мкМ β-аланіну: за 100% прийнято початкову швидкість накопичення [<sup>3</sup>H]-ГАМК без додавання інгібіторів, n = 7

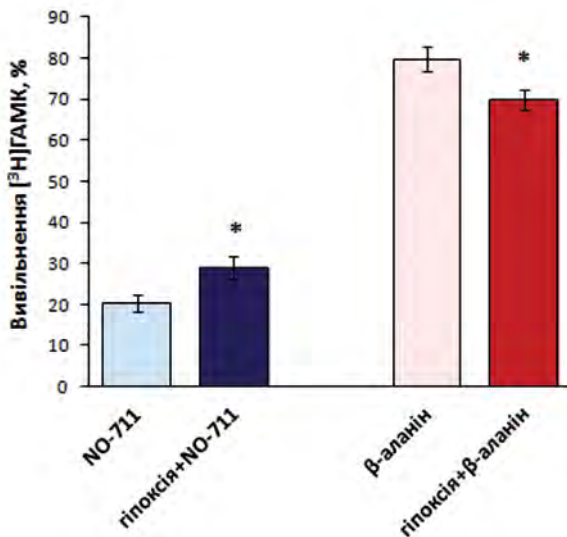


Рис. 5. Початкова швидкість накопичення  $[^3\text{H}]\text{-ГАМК}$  синаптосомами таламуса щурів під впливом 30  $\mu\text{M}$  NO-711 та 100  $\mu\text{M}$   $\beta$ -аланіну: за 100% прийнято початкову швидкість накопичення  $[^3\text{H}]\text{-ГАМК}$  без додавання інгібіторів,  $n = 6$

виконує важливу функцію сигналізації для формування синапсів і синаптичної мережі. Патологічні наслідки гіпоксії, перенесеної у ранньому віці, можуть бути результатом порушення регуляції процесу дозрівання мозку [38].

Одним із підходів до моделювання стану перинатальної гіпоксії є створення умов короткострокової (15–20 хв) глобальної гіпоксії шляхом розташування тварин у камерах, де повітряна атмосфера заміщена на газову суміш, що складається з 3–4% кисню і 96% азоту. Такі умови спричиняють у 10–11-добових щурів тоніко-клонічну судомну активність. Дослідження зрізів гіпокампа 70–80-добових щурів (через 8–9 тижнів після гіпоксії) дали змогу виявити гострі та хронічні зміни збудливості нейронів гіпокампа, проте явних морфологічних змін не спостерігали [12, 14].

ГАМК відіграє ключову роль у регуляції збудливості нейронів і підтриманні балансу між процесами гальмування та збудження. Сполуки, що взаємодіють із транспортерами ГАМК GAT1- та GAT3-типів, становлять особливий інтерес з погляду підвищення ГАМК-нейротрансмісії, особливо це стосується високоселективних інгібіторів GAT3, і на сьогодні про них дуже мало відомо [3]. Дотепер для лікування парціальних епілептичних нападів використовували тільки тіагабін — селективний інгібітор транспортеру GAT1 [25].

Початкову швидкість високоафінного накопичення  $[^3\text{H}]\text{-ГАМК}$  було досліджено на ізольованих нервових терміналях головного мозку щурів (синаптосомах), які зберігають

усі особливості інтактних нервових закінчень. Ми продемонстрували зниження початкової швидкості накопичення  $[^3\text{H}]\text{-ГАМК}$  синаптосомами кори і гіпокампа, виділених із мозку щурів через 8–9 тижнів (період досягнення статевої зрілості) після того, як вони зазнали впливу гіпоксії та судом (у віці 10–12 днів), порівняно з контрольними, але жодних змін у таламусі не знайдено. Ці дані відповідають нашим попереднім результатам щодо оцінки позаклітинного рівня  $[^3\text{H}]\text{-ГАМК}$  у нервових закінченнях після перинатальної гіпоксії. Нами було виявлено довготривале підвищення рівня позаклітинної  $[^3\text{H}]\text{-ГАМК}$  у корі та гіпокампі, тимчасом як у таламусі таких змін не спостерігали [34, 39].

Враховуючи те, що основними типами ГАМК-транспортерів, які визначають оптимальний рівень позаклітинної ГАМК у головному мозку, є GAT1 і GAT3, ми проаналізували вплив високоселективного блокатора GAT1 — NO-711 та субстратного інгібітора GAT3 —  $\beta$ -аланіну на накопичення  $[^3\text{H}]\text{-ГАМК}$  нервовими закінченнями головного мозку щурів. Було показано, що в синаптосомах кори ефективність дії NO-711 та  $\beta$ -аланіну не змінювалась після перинатальної гіпоксії порівняно з контролем. У нервових закінченнях гіпокампа і таламуса ефективність дії  $\beta$ -аланіну підвищувалась унаслідок впливу перинатальної гіпоксії, тоді як NO-711 — зменшувалась. Наші дані про вплив NO-711 і  $\beta$ -аланіну в таламусі дають підстави вважати, що співвідношення експресованих на мембрані транспортерів GAT1- і GAT3-типів під впливом перинатальної гіпоксії змінюється, забезпечуючи таким чином компенсаторний механізм, що лежить в основі підтримання оптимального рівня позаклітинної ГАМК. Водночас відсутність змін в ефективності дії NO-711 та  $\beta$ -аланіну в корі головного мозку може свідчити про стабільність співвідношення GAT1/GAT3 після перинатальної гіпоксії. Нещодавно ми також показали, що перинатальна гіпоксія не спричинює змін у спорідненості до субстрату ГАМК-транспортерів у корі, гіпокампі й таламусі [34], і це дає підстави припустити, що зміна ефективності дії інгібіторів після перинатальної гіпоксії більшою мірою пов'язана зі змінами кількості транспортерів у плазматичній мембрані, ніж зі спорідненістю інгібіторів до субстратів'язувальних сайтів транспортерів ГАМК.

Наші припущення про те, що внаслідок впливу гіпоксії змінюється експресія різних типів транспортерів ГАМК, підтверджують і дані літератури. Зокрема, Melone і співавт.

[40] показали, що тимчасова фокальна ішемія у щурів зумовлює нову нейрональну експресію транспортерів GAT3-типу в корі біля місць ушкодження. Dalby і співавт. [19] зазначили, що за епілепсії для ефективності дії неселективних інгібіторів накопичення ГАМК вкрай важливим є саме співвідношення GAT1/GAT3. З'ясовано, що активація GAT1 протеїнкіназою C, індукована серин/треоніновим фосфорилуванням, у свою чергу, сприяє інтерналізації GAT1, а за присутності активаторів тирозинкінази прискорюється вбудовування GAT1 у плазматичну мембрану [41]. Слід також зазначити, що GAT3-опосередковане поглинання ГАМК відіграє роль тільки за певних фізіологічних чи патологічних умов, і це призводить до підвищення активності нейронів та нормалізує рівень вивільнення ГАМК у стріатумі [42].

Експерименти із застосуванням екзогенного  $\beta$ -аланіну становлять особливий інтерес, оскільки ця молекула легко всмоктується зі шлунково-кишкового тракту і транспортується до ЦНС.  $\beta$ -Аланін потрапляє до ЦНС через гематоенцефалічний бар'єр за допомогою тауринчутливого транспортера  $\beta$ -амінокислот  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ -залежним чином. Цей транспортер є високоселективним для  $\beta$ -амінокислот, оскільки ані L-глутамат (який транспортується аніонним транспортером амінокислот), ані L-фенілаланін (транспортується нейтральним транспортером амінокислот) не впливають на рух  $\beta$ -аланіну через гематоенцефалічний бар'єр.  $\beta$ -Аланін також може долати гематоенцефалічний бар'єр шляхом пасивної дифузії [26]. Аналоги  $\beta$ -аланіну пропонують для лікування епілепсії і як основу для створення протиепілептичних препаратів [28]. За перорального введення концентрація  $\beta$ -аланіну в плазмі крові зростає швидко, досягаючи максимуму через 30–45 хв, і значно знижується протягом 90–120 хв [43]. Попри те, що  $\beta$ -аланін є простою амінокислотою, він залишається малодослідженим і як неврологічний препарат, і як основа для створення нових терапевтичних препаратів [44].

Наші дані щодо впливу  $\beta$ -аланіну можуть бути важливими ще й тому, що він має фізіологічне значення.  $\beta$ -Аланін широко представлений у мозку і є однією з небагатьох природних  $\beta$ -амінокислот ендogenous походження у людини та ссавців. Середня концентрація  $\beta$ -аланіну в головному мозку варіює між 0,03 та 0,08 мМ. Цей діапазон є аналогічним концентрації ГАМК у ЦНС [3]. Детальне вивчення концентрації  $\beta$ -аланіну в головному мозку щурів дало змогу виявити регіональні відмінності: середній мозок містить найвищу кон-

центрацію (0,108 ммоль/г замороженої маси); кора — 0,065 ммоль/г, тимчасом як мозочок — 0,039 ммоль/г. Відмінність концентрацій у різних структурах ЦНС характерна і для ГАМК. У ЦНС  $\beta$ -аланін послаблює нейрональну активність з такою самою ефективністю, як і ГАМК [26]. Однак роль  $\beta$ -аланіну в розвитку неврологічних розладів потребує подальших досліджень. У цьому контексті наші дані можуть бути важливими для аналізу ймовірного міжсинаптичного перехресного впливу між ГАМК- та  $\beta$ -аланін-ергічними нервовими терміналями, адже вивільнений із нервових терміналей  $\beta$ -аланін може інгібувати поглинання ГАМК транспортерами GAT3-типу. Крім того, Mathers і співавт. [45] нещодавно показали, що хімічна передача у гальмівних синапсах таламуса включає активацію рецепторів  $\beta$ -аланіном. Важливість  $\beta$ -аланіну для синаптичної передачі підтверджується тим фактом, що у пацієнтів з  $\beta$ -аланінемією (накопичення  $\beta$ -аланіну як вроджене порушення метаболізму) можуть розвиватися неврологічні відхилення, механізми яких досі є незрозумілими [46].

Слід наголосити, що окрім ГАМК-транспортерів  $\beta$ -аланін має п'ять визначених сайтів зв'язування з рецепторами: сайт коагоніста гліцину на NMDA рецепторі; сайт на гліциновому рецепторі; сайти на ГАМКА- і ГАМКС-рецепторах [26]. Пресинаптичні глутаматні рецептори NMDA-типу локалізовані на нервових терміналях гіпокампа та кори головного мозку. Активація глутаматних рецепторів може впливати на ефективність як збуджувальної, так і гальмівної нейропередачі. Хоч у наших експериментах і не було виявлено впливу  $\beta$ -аланіну на накопичення L-[ $^{14}\text{C}$ ]-глутамату синаптосомами кори, гіпокампа і таламуса, однак необхідними є подальші дослідження його взаємодії з глутаматними рецепторами. Оскільки дисбаланс між збудженням і гальмуванням вважають вирішальним фактором в етіології неврологічних розладів, що виникають після гіпоксії та судом у ранньому віці,  $\beta$ -аланін може мати широкий спектр застосування, зокрема як додаткове регулювання ГАМК-та глутаматергічної нейротрансмісії.

Таким чином, встановлено, що здатність  $\beta$ -аланіну інгібувати накопичення ГАМК посилюється у нервових закінченнях гіпокампа і таламуса в результаті перинатальної гіпоксії, тимчасом як ефективність NO-711 у нервових закінченнях таламуса знижується. Це може бути наслідком зміни співвідношення активних транспортерів — GAT1/GAT3, експресованих на плазматичній мембрані нервових закінчень після перинатальної



гіпоксії. Цей факт вказує на можливість цілеспрямованої модуляції активності транспортера GAT3 та ГАМК-ергічної нейротрансмісії за умов патологічних станів за допомогою екзогенного та ендogenous β-аланіну.

Роботу виконано за підтримки гранту № 12-14 Цільової комплексної програми

фундаментальних досліджень НАН України «Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва»; гранту № 35/15 програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» і проекту УНТЦ № 6055.

## REFERENCES

1. Richerson G. B., Wu Y. Role of GABA transporter in epilepsy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2004, V. 548, P. 76–91. doi:10.1007/978-1-4757-6376-8\_6.
2. Richerson G. B., Wu Y. The dynamic equilibrium of neurotransmitter transporters: not just for reuptake anymore. *J. Neurophysiol.* 2003, V. 90, P. 1363–1374.
3. Borden L. A. GABA transporter heterogeneity: pharmacology and cellular localization. *Neurochem. Int.* 1996, V. 29, P. 335–356. doi:10.1016/0197-0186(95)00158-1.
4. Schousboe A., Kanner B. GABA transporters: Functional and pharmacological properties. In: *Glutamate and GABA Receptors and Transporters; Structure, Function and Pharmacology.* London: Taylor and Francis. 2002, V. 43, P. 337–349.
5. Zhou Y., Danbolt N. C. GABA and Glutamate Transporters in Brain. *Front Endocrinol.* 2013, 4(165), 1–14. doi:10.3389/fendo.2013.00165.
6. Borisova T., Krisanova N. Presynaptic transporter-mediated release of glutamate evoked by the protonophore FCCP increases under altered gravity conditions. *Adv. Space Res.* 2008, V. 42, P. 1971–1979.
7. Borisova T., Krisanova N., Sivko R., Borysov A. Cholesterol depletion attenuates tonic release but increases the ambient level of glutamate in rat brain synaptosomes. *Neurochem. Int.* 2010, V. 56, P. 466–478.
8. Borisova T., Sivko R., Borysov A., Krisanova N. Diverse presynaptic mechanisms underlying methyl-beta-cyclodextrin — mediated changes in glutamate transport. *Cell Mol. Neurobiol.* 2010, 30(7), 1013–1023. doi:10.1007/s10571-010-9532-x.
9. Borisova T. Cholesterol and presynaptic glutamate transport in the brain. *New York: Springer.* 2013, 78 p.
10. Krisanova N., Triakash I., Borisova T. Synaptopathy under conditions of altered gravity: Changes in synaptic vesicle fusion and glutamate release. *Neurochem. Int.* 2009, V. 55, P. 724–731.
11. Vannucci S. J., Hagberg H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J. Exp. Biol.* 2004, V. 207, P. 3149–3154. doi:10.1242/jeb.01064.
12. Jensen F. E., Wang C., Stafstrom C. E., Liu Z., Geary C., Stevens M. C. Acute and chronic increases in excitability in rat hippocampal slices after perinatal hypoxia in vivo. *J. Neurophysiol.* 1998, V. 79, P. 73–81.
13. Jensen F. E., Wang C. Hypoxia-induced hyperexcitability in vivo and in vitro in the immature hippocampus. *Epilepsy Res.* 1996, V. 26, P. 131–140. doi:10.1016/S0920-1211(96)00049-6.
14. Owens J., Robbins C. A., Wenzel J., Schwartzkroin P. A. Acute and chronic effects of hypoxia on the developing hippocampus. *Ann. Neurol.* 1997, V. 41, P. 187–199.
15. Haut S. R., Veliskova J., Moshe S. L. Susceptibility of immature and adult brains to seizure effects. *Lancet Neurol.* 2004, V. 3, P. 608–617.
16. During M. J., Ryder K. M., Spencer D. D. Hippocampal GABA transporter function in temporal-lobe epilepsy. *Nature.* 1995, V. 376, P. 174–177.
17. Sarup A., Larsson O. M., Schousboe A. GABA transporters and GABA transaminase as drug targets. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 2003, V. 4, P. 269–277.
18. Czapinski P., Blaszczyk B., Czuczwar S. J. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Curr. Top. Med. Chem.* 2005, V. 5, P. 3–14.
19. Dalby N. O. Inhibition of  $\gamma$ -aminobutyric acid uptake: anatomy, physiology and effects against epileptic seizures. *Europ. J. Pharmacol.* 2003, V. 479, P. 127–137. doi:10.1016/j.ejphar.2003.08.063
20. Liu Q.-R., Lopez-Corcuera B., Mandiyan S., Nelson H., Nelson N. Molecular characterization of four pharmacologically distinct  $\gamma$ -aminobutyric acid transporters in mouse brain. *J. Biol. Chem.* 1993, 268(3), 2106–2112.
21. Sutch R. J., Davies C. C., Bowery N. G. GABA release and uptake measured in crude synaptosomes from Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS). *Neurochem. Int.* 1999, V. 34, P. 415–425.
22. Kersante F., Rowley S. C., Pavlov I., Gutićrez-Mecinas M., Semyanov A., Reul J. M. A functional role for both  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) transporter-1 and GABA transporter-3 in the modulation of extracellular GABA and GABAergic tonic conductances in the rat hippocampus. *J. Physiol.* 2013, V. 591, P. 2429–2441. doi:10.1113/jphysiol.2012.246298.
23. Madsen K. K., White H. S., Schousboe A. Neuronal and non-neuronal GABA transporters as targets for antiepileptic drugs. *Pharmacol. Ther.* 2010, V. 125, P. 394–401. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.11.007.

24. Meldrum B. S., Rogawski M. A. Molecular targets for antiepileptic drug development. *Neurotherapeutics*. 2007, V. 4, P. 18–61. doi:10.1016/j.nurt.2006.11.010.
25. Salat K., Więckowska A., Więckowski K., Höfner G. C., Kamiński J., Wanner K. T., Malawska B., Filipek B., Kuliget K. Synthesis and pharmacological properties of new GABA uptake inhibitors. *Pharmacol. Rep.* 2012, 64 (4), 817–833. doi:10.1016/S1734-1140(12)70877-0.
26. Tiedje K. E., Stevens K., Barnes S., Weaver D. F.  $\beta$ -Alanine as a small molecule neurotransmitter. *Neurochem Int.* 2010, V. 57, P. 177–188. doi:10.1016/j.neuint.2010.06.001.
27. Krishtal O. A., Osipchuk Y. V., Vrublevsky S. V. Properties of glycine-activated conductance in rat brain neurons. *Neurosci. Lett.* 1988, V. 84, P. 271–276.
28. Tan C. Y. K., Wainman D., Weaver D. N.,  $\alpha$ -, and  $\beta$ - substituted 3-aminopropionic acids: design, syntheses and antiseizure activities. *Bioorg. Med. Chem.* 2003, V. 11, P. 113–121. doi:10.1016/S0968-0896(02)00330-9.
29. Monaghan D. T., Irvine M. W., Costa B. M., Fang G., Jane D. E. Pharmacological Modulation of NMDA Receptor Activity and the Advent of Negative and Positive Allosteric Modulators. *Neurochem. Int.* 2012, 61 (4), 581–592.
30. Cotman C. W. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions. *Meth. Enzymol.* 1974, V. 31, P. 445–452. doi:10.1016/0076-6879(74)31050-6.
31. Borisova T., Krisanova N., Himmelreich N. Exposure of animals to artificial gravity conditions leads to the alteration of the glutamate release from rat cerebral hemispheres nerve terminals. *Adv. Space Res.* 2004, V. 33, P. 1362–1367.
32. Borisova T., Himmelreich N. Centrifuge-induced hypergravity: [ $^3\text{H}$ ]GABA and l-[ $^{14}\text{C}$ ] glutamate uptake, exocytosis and efflux mediated by high-affinity, sodium-dependent transporters. *Adv. Space Res.* 2005, V. 36, P. 1340–1345.
33. Larson E., Howlett B., Jagendorf A. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination. *Anal. Biochem.* 1986, 155 (2), 243–248. doi:10.1016/0003-2697(86)90432-X.
34. Pozdnyakova N., Yatsenko L., Parkhomenko N., Himmelreich N. Perinatal hypoxia induces long-lasting increase in unstimulated GABA release in rat brain cortex and hippocampus. The protective effect of pyruvate. *Neurochem. Int.* 2011, V. 58, P. 14–21. doi:10.1016/j.neuint.2010.10.004.
35. Borisova T., Nazarova A., Dekaliuk M., Krisanova N., Pozdnyakova N., Borysov A., Sivko R., Demchenko A. P. Neuromodulatory properties of fluorescent carbon dots: effect on exocytotic release, uptake and ambient level of glutamate and GABA in brain nerve terminals. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2015, V. 59, P. 203–215.
36. Soldatkin O., Nazarova A., Krisanova N., Borysov A., Kucherenko D., Kucherenko I., Pozdnyakova N., Soldatkina A., Borisova T. Monitoring of the velocity of high-affinity glutamate uptake by isolated brain nerve terminals using amperometric glutamate biosensor. *Talanta*. 2015, V. 135, P. 67–74.
37. Sudhof T. C. The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.* 2004, V. 27, P. 509–547. doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412.
38. Ben-Ari Y. Excitatory actions of GABA during development: the nature of nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* 2002, V. 3, P. 728–739. doi:10.1038/nrn920.
39. Yatsenko L., Pozdnyakova N., Dudarenko M., Himmelreich N. The dynamics of changes in hippocampal GABAergic system in rats exposed to early-life hypoxia-induced seizures. *Neurosci. Lett.* 2012, V. 524, P. 69–73.
40. Melone M., Cozzi A., Pellegrini-Giampietro D. E., Conti F. Transient focal ischemia triggers neuronal expression of GAT-3 in the rat perilesional cortex. *Neurobiol. Dis.* 2003, V. 14, P. 120–132. doi:10.1016/S0969-9961(03)00042-1.
41. Hu J., Quick M. W. Substrate-mediated regulation of gammaaminobutyric acid transporter1 in rat brain. *Neuropharmacology*. 2008, V. 54, P. 309–318. doi:10.1016/j.neuropharm.2007.09.013.
42. Kirmse K., Kirischuk S., Grantyn R. Role of GABA transporter 3 in GABAergic synaptic transmission at striatal output neurons. *Synapse*. 2009, V. 63, P. 921–929. doi:10.1002/syn.20675.
43. Harris R. C., Tallon M. J., Dunnett M., Boobis L., Coakley J., Kim H. J., Fallowfield J. L., Hill C. A., Sale C., Wise J. A. The absorption of orally supplied beta-alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis. *Amino Acids*. 2006, 30 (3), 279–289. doi:10.1007/s00726-006-0299-9.
44. MacPhee S., Weaver I. N., Weaver D. F. An evaluation of interindividual responses to the orally administered neurotransmitter  $\beta$ -alanine. *J. Amino Acids*. 2013, (429847), 5 p. doi:10.1155/2013/429847.
45. Mathers D. A., McCarthy S. M., Cooke J. E., Ghavanini A. A., Puil E. Effects of the beta-amino acid antagonist TAG on thalamocortical inhibition. *Neuropharmacology*. 2009, V. 56, P. 1097–1105. doi:10.1016/j.neuropharm.2009.03.008.
46. Gemelli T., de Andrade R. B., Rojas D. B., Bonorino N. F., Mazzola P. N., Tortorelli L. S., Funchal C., Filho C. S. D., Wannmacher C. M. D. Effects of  $\beta$ -alanine administration on selected parameters of oxidative stress and phosphoryltransfer network in cortex and cerebellum of rats. *Mol. Cell Biochem.* 2013, 380 (1–2), 161–170. doi:10.1007/s11010-013-1669-8.

**ВЛИЯНИЕ NO-711 И  $\beta$ -АЛАНИНА  
НА НАКОПЛЕНИЕ ГЛУТАМАТА  
И  $\gamma$ -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ  
НЕРВНЫМИ ТЕРМИНАЛЯМИ  
ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС  
ПОСЛЕ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ**

*М. В. Дударенко, Л. М. Яценко, М. В. Писковая,  
А. Г. Назарова, О. А. Воронова, А. О. Пастухов,  
Н. Г. Позднякова*

Институт биохимии им. А.В. Палладина  
НАН Украины, Киев

*E-mail: natapoz@biochem.kiev.ua*

Целью исследования было проанализировать эффекты высокоселективного блокатора транспортеров  $\gamma$ -аминомасляной кислоты GAT1-типа, NO-711 и субстратного ингибитора транспортеров  $\gamma$ -аминомасляной кислоты GAT3-типа  $\beta$ -аланина на начальную скорость накопления L-[ $^{14}$ C]глутамата и [ $^3$ H]- $\gamma$ -аминомасляной кислоты нервными окончаниями (синапсосомами) коры, гиппокампа и таламуса головного мозга крыс в норме и после перинатальной гипоксии.

Состояние перинатальной гипоксии моделировали, помещая 10–12-суточных крыс в герметичную камеру, где атмосфера содержала 4% кислорода и 96% азота. В эксперимент брали животных через 8–9 недель после того, как они подверглись воздействию гипоксии, и контрольных того же возраста. NO-711 (30 мкМ) и  $\beta$ -аланин (100 мкМ) не влияли на начальную скорость накопления L-[ $^{14}$ C]глутамата синапсосомами коры, гиппокампа и таламуса. В синапсосомах коры NO-711 и  $\beta$ -аланин снижали начальную скорость накопления [ $^3$ H]- $\gamma$ -аминомасляной кислоты, но эффективность их ингибирующего действия не изменялась после перинатальной гипоксии по сравнению с контролем. Вследствие влияния перинатальной гипоксии эффективность действия  $\beta$ -аланина усиливалась в синапсосомах гиппокампа и таламуса, в то же время эффективность действия NO-711 снижалась.

Полученные результаты могут свидетельствовать об изменении соотношения активных транспортеров ГАМК — GAT1 и GAT3, экспрессированных на плазматической мембране нервных окончаний после перинатальной гипоксии. Таким образом,  $\beta$ -аланин является перспективным веществом для разработки нейротропных фармакологических препаратов, направленных на транспортер-опосредованную регуляцию ГАМК-эргической нейротрансмиссии.

**Ключевые слова:** перинатальная гипоксия, высокоаффинные специфические мембранные ГАМК-транспортеры, NO-711,  $\beta$ -аланин.

**THE EFFECTS OF NO-711 AND  $\beta$ -ALANINE  
ON GLUTAMATE AND  $\gamma$ -AMINOBUTYRIC  
ACID UPTAKE BY NERVE TERMINALS  
ISOLATED FROM RATS AFTER  
PERINATAL HYPOXIA**

*M. V. Dudarenko, L. M. Yatsenko, M. V. Piskova,  
A. G. Nazarova, O. O. Voronova, A. O. Pastukhov,  
N. G. Pozdnyakova*

Palladin Institute of Biochemistry,  
of the National Academie of Sciences  
of Ukraine, Kyiv

*E-mail: natapoz@biochem.kiev.ua*

The effects of highly-selective blocker of  $\gamma$ -aminobutyric acid transporters of GAT1, NO-711, and substrate inhibitor of  $\gamma$ -aminobutyric acid transporters GAT3,  $\beta$ -alanine on the initial velocity of L-[ $^{14}$ C]glutamate and [ $^3$ H]- $\gamma$ -aminobutyric acid uptake by cortical, hippocampal and thalamic nerve terminals (synaptosomes) were analyzed in norm and after perinatal hypoxia.

Rats were underwent to hypoxia and seizures (airtight chamber, 4% O<sub>2</sub> and 96% N<sub>2</sub>) at the age of 10–12 postnatal days. The experiments were performed at 8–9 weeks in the control and after hypoxia. It was shown that NO-711 (30 microM) and  $\beta$ -alanine (100 microM) did not affect initial velocity of L-[ $^{14}$ C] glutamate uptake by cortical, hippocampal and thalamic synaptosomes. In cortical synaptosomes, NO-711 and  $\beta$ -alanine decreased the initial velocity of [ $^3$ H]- $\gamma$ -aminobutyric acid uptake, but their inhibitory effects were similar in control and hypoxia groups. The effectiveness of  $\beta$ -alanine to influence [ $^3$ H]- $\gamma$ -aminobutyric acid uptake was increased in hippocampal and thalamic nerve terminals as a result of perinatal hypoxia, whereas the capacity of NO-711 in thalamic nerve terminals was decreased.

These results suggest changes in the ratio of active GAT1/GAT3 expressed in the plasma membrane of nerve terminals after perinatal hypoxia. Thus,  $\beta$ -alanine is a promising substance for development of neurotropic pharmacological preparations for the transporter-mediated regulation of GABA-ergic neurotransmission.

**Key words:** perinatal hypoxia, plasma membrane GABA transporters, NO-711,  $\beta$ -alanine.