


e-ISSN: 2345-0592 <b>Online issue</b> Indexed in <i>Index Copernicus</i>	<b>Medical Sciences</b>  Official website: <a href="http://www.medicisciences.com">www.medicisciences.com</a>	
--	--	---

## Effects of glutamate and gamma-aminobutyric acid receptor modulation on the developing brain

Dalia Zykutė<sup>1</sup>, Jokūbas Liutkus<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Faculty of Medicine, Kaunas, Lithuania*

### Abstract

The repercussions of early, long-lasting anaesthesia on child brain function are not established. Nervous system development continues throughout childhood, therefore central nervous system agents could have permanent effects on neurological functions. The early development of synaptic junctions and formation of neural networks, selective synapse elimination and maturation are important for the establishment of proper brain function. Therefore, the use of pharmacological agents on an immature brain could cause impairment of proper neurological organization. Neurotransmitters gamma-aminobutyric acid (GABA) and glutamate play an important role in various stages of development – from cell proliferation to proper neural network formation. Both gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors and N-methyl-D-aspartate (NMDA) ionotropic glutamate receptors are targets of commonly used anaesthetic agents – such agents could potentially be neurotoxic and cause neurodevelopmental disturbances. Even though in vitro and animal experimental data show neurotoxic effects, clinical evidence in humans is still lacking. Due to the heterogeneity of study designs and extensive confounding, it is difficult to draw solid conclusions. Therefore, in this review we discuss brain development, the role of glutamate and GABA, effects of modulating GABA<sub>A</sub> and NMDA receptors in the developing brain and current prospects of clinical trials.

**Keywords:** brain development; anaesthesia; gamma-aminobutyric acid; N-metil-D-aspartate receptor.

# Glutamato ir GABA receptorių moduliacijos poveikis besivystančioms smegenims

Dalia Zykutė<sup>1</sup>, Jokūbas Liutkus<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lietuvos Sveikatos Mokslų Universitetas, Medicinos akademija, Medicinos fakultetas, Kaunas, Lietuva

## Santrauka

Ankstyvos, ilgai truncančios anestezijos poveikis vaikų smegenų veiklai nėra žinomas. Nervų sistemos vystymasis tęsiasi visą vaiko brendimo laikotarpį, todėl nervų sistemą veikiantys medikamentai gali turėti ilgalaikį poveikį neurologinėms funkcijoms. Ankstyvas sinapsinių jungčių ir neuronų tinklų formavimasis, selektyvi sinapsių eliminacija ir brendimas yra svarbūs pažinimo, sudėtingų kognityvinių funkcijų formavimuisi ir priklauso nuo stimuliacinių ir slopinančių neurotransmiterių poveikio. Glutamatas ir gama amino sviesto rūgštis (GABA) yra svarbūs daugelyje smegenų vystymosi etapų – nuo ląstelių proliferacijos iki tinkamų neuroninių tinklų susiformavimo. Jų funkcijos sutrikdymas smegenų brendimo metu gali turėti įtakos nervų sistemos organizacijai. Anestetikų poveikis pasireiškia per N-metil-D-aspartato (NMDA) – jonotropinio glutamato receptoriaus ir gama amino sviesto rūgšties (GABA) receptoriaus moduliaciją, todėl galėtų veikti ir smegenų vystymosi procesus. Nepaisant sėkmingų in vitro, eksperimentinių tyrimų su gyvūnais, anestetikų poveikis žmogaus smegenų vystymuisi nėra įrodytas klinikiniais tyrimais su žmonėmis – tyrimai skiriasi tarpusavyje, rezultatų interpretaciją sunkina iškreipantieji veiksniai. Šiame straipsnyje apžvelgiamas smegenų vystymasis, sinaptogenezė, glutamato ir GABA neurotransmiterių svarba, NMDA ir GABAa receptorių moduliacijos reikšmė neuronų jungčių brendimui bei vykdomų klinikinių tyrimų iššūkiai ir tikslai.

**Raktiniai žodžiai:** smegenų vystymasis; anestezija; gama amino sviesto rūgštis; N-metil-D-aspartato receptorius.

## 1. Įvadas

Žmogaus smegenų vystymasis yra ilgas procesas, kuris prasideda trečią gestacinę savaitę pirmtakių nervinių ląstelių diferenciacija ir tęsiasi iki vėlyvos paauglystės, galbūt net ir visą gyvenimą. Tiek genetiniai faktoriai, tiek aplinkos stimulai yra būtini smegenų vystymuisi ir bet kurio proceso sutrikdymas gali sąlygoti pakitusias neurologines išėtis [1]. Žmogaus smegenų brendimas yra ilgesnis nei kitų rūšių gyvūnų. Tai iš dalies sąlygota žmonių smegenų žievės, ypač frontalinės žievės, didelio tūrio. Ilgas smegenų vystymasis taip yra svarbus, nes gaunant impulsus iš aplinkos vyksta mokymasis [2]. Vienas iš aktualių klausimų yra anestetikų poveikis besivystančioms smegenims. Nors in vitro ir eksperimentiniams gyvūnams anestetikai sukelia akivaizdžius pokyčius, studijos su žmonėmis kol kas neparodė stabilių rezultatų ir aiškių išvadų [3].

## 2. Smegenų vystymasis

Smegenų vystymasis vyksta etapais. 3-4 gestacinę savaitę susiformuoja nervinis vamzdelis, kurį seka ląstelių proliferacija ir migracija. Didėja smegenų tūris, paviršiaus plotas bei formuojasi kompleksiška struktūra. Neurogenezė ir smegenų architektūros formavimasis yra beveik pasibaigęs gimimo metu, tačiau postnataliniu periodu vis dar vyksta gliocitų (astrocitų ir oligodendrocitų) brendimas, sinaptogenezė ir sinapsių karpymas bei mielinizacija – šie procesai reprezentuoja postnatalinį smegenų augimą. Smegenų brendimas pasibaigia 20 – 25 gyvenimo metais, tačiau

manoma, kad smegenų struktūra yra moduluojama keičiant jungtis tarp neuronų visą gyvenimą, veikiant išoriniams faktoriams. Šios sudėtingos struktūros išsivystymui būtina įvairių nervinių ir ne nervinių ląstelių sąveika, tinkamas ląstelių kiekis, išsidėstymas erdvėje ir laike. Atitinkamų jungčių tarp neuronų susiformavimas ir komunikacija tarp ląstelių yra būtini, siekiant, kad susiformuotų centralizuota elgesio kontrolė, suvokimas ir sudėtingos kognityvinės funkcijos. [4]

Viena svarbiausių nervų sistemos ypatybių yra sinapsių jungtys ir jų brendimo laikotarpiu susiformuojančios neuronų grandinėlės, kurios sąlygoja bendrąsias smegenų funkcijas, elgesį ir kognityvines funkcijas. Sinaptogenezė, neuronų grandinėlių susidarymas yra genetiškai nulemtas procesas ir vyksta etapais: aksonų taikinio atpažinimas (kelio radimas), sinapsių susiformavimas ir pre/postsinaptinių specializacijų susidarymas, sinapsių karpymas ir stabilizacija. Vaisiaus laikotarpiu, jungtys yra sudaromos veikiant vidiniams veiksnams, pavyzdžiui, tinklainės bangoms. Po gimimo, sinapsių ir neuronų grandinėlių funkcionavimas priklauso nuo sąveikos su aplinkos sukeltais stimulai [4]. Postnatalinis vystymasis yra asocijuojamas su naujų sinapsių susidarymu, selektyvia sinapsių eliminacija ir išlikusių sinapsių brendimu [5]. Iki 2 metų amžiaus smegenyse yra per daug sinapsinių ryšių – sinapsių eliminacija reikalinga tam, kad galėtų susiformuoti produktyvūs ir reikalingi, prie aplinkos pritaikyti ryšiai ir neuronų tinklai. Eliminacija yra sąlygojama išorinių aplinkos faktorių ir yra svarbi mokymuisi (angl. „use it or lose it“ fenomenas) [4]. Nepakankama ar per

didelė sinapsių eliminacija galėtų būti tokių ligų kaip autizmas, šizofrenija ar epilepsija patogenetinis veiksnys [5].

Nervų sistemos vystymuisi būdinga glijos bei nervinių ląstelių, nervinių ataugų ir sinapsių perprodukcija, todėl didelė dalis nervinių ląstelių patiria apoptozę. Prenatalinė apoptozė vyksta visoje žievėje, visų tipų ląstelėse ir kai kuriuose žievės sluoksniuose pasiekia iki 70 proc. eliminaciją. Vienas iš faktorių, kuris apsaugo ląsteles yra neurotrofinės medžiagos. Remiantis neurotrofine hipoteze, neuronai, kurie sudaro efektyvias jungtis, gauna daugiau neurotrofinių faktorių ir dėl to gali išvengti apoptozės. Formuojasi efektyvūs ir funkcionalūs neuronai, kurie vėliau formuos funkcionuojančius neuronų ryšius. Postnataliniu periodu vykstanti glijos apoptozė priklauso nuo iš aksonų gaunamų signalų. Glija, esanti toliau nuo aksonų ir negaunanti signalų patiria apoptozę. Tai yra svarbu, nes išlikusi glija turi atitikti aksonų išsidėstymą [1].

### 3. Glutamato reikšmė smegenų vystymuisi

Glutamatas ir aspartatas yra dominuojantys stimuliaciniai amino rūgščių neurotransmiteriai piramidinėse ląstelėse. [6] Sinapsėje vykstanti mediatorių transmisija ne tik nulemia funkcinį sinapsės brendimo statusą, bet ir lemia sinapsės panaikinimą ar sustiprinimą bręstant smegenims. Stimuliuojančių sinapsių suidarymui svarbi glutamato transmisija, nuo kurios priklauso daug vystymuisi reikalingų elementų: nuo aktyvumo priklausomos validacijos ir brendimo iki varžymosi (tik stipriausios, stimulus gaunačios sinapsės išsaugomos) ir plastiškumo [7]. Glutamato taikiniai yra tiek metabotropiniai, tiek jonotropiniai receptoriai. Vienas iš jonotropinių receptorių, dominuojančių nebrandžioje smegenyse, yra N-metil-D-aspartato (NMDA) receptorius, kurio aktyvavimas lemia  $\text{Na}^+$  ir  $\text{Ca}^{2+}$  jonų patekimą į

ląstelę. Besivystančiose smegenyse sinapsėse vykstanti transmisija yra silpna, o pačios sinapsės labai plastiškos. NMDA kanalai yra svarbūs mokymuisi ir atminčiai, nes yra susiję su ilgalaikio signalo potenciacija ir sinapsių plastiškumo palaikymu, sinapsių persitvarkymu kritiniais vystymosi periodais [6]. Sinaptogenezės ir fiziologinės apoptozės metu, neuronai yra jautrūs eksitotoksiškumui dėl per didelės NMDA ir kitų glutamato receptorių aktyvacijos [8] – padidėjusi  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracija gali sukelti ląstelių apoptozę [6]. NMDA receptorių blokada taip pat yra susijusi su padidėjusia apoptoze, todėl NMDA moduliacija tam tikrais smegenų brendimo etapais galėtų sąlygoti mokymosi sutrikimus [8].

### 4. Gama amino sviesto rūgšties reikšmė smegenų vystymuisi

Gama amino sviesto rūgštis (GABA) yra dominuojantis neurotransmiteris nepiramidinėse smegenų ląstelėse. Tai yra pagrindinis inhibitorinis neurotransmiteris subrendusiose žinduolių smegenyse, tačiau ankstyvoje smegenų brendimo fazėje atlieka kitokią, tačiau kritinę funkciją. Iki sinapsių susiformavimo, GABA perduoda signalą parakrininiu ir autokrininiu keliais, taip reguliuoja embrioninių ir nervinių ląstelių proliferaciją ir diferenciaciją, migraciją, sinapsių brendimą ir ląstelių mirtį. GABAa receptoriai yra jonotropinis chloro jonų kanalas – tai transmembraninis baltymas sudarytas iš kelių subvienetų, prie kurių gali jungtis įvairios medžiagos (pvz.: benzodiazepinai, barbitūratai, etanolis) ir moduluoti kanalo atsidarymą.

Ankstyvo vystymosi fazėje, nervinėse ląstelėse yra didelė  $\text{Cl}^-$  jonų koncentracija. GABAa receptoriaus aktyvacija atveria  $\text{Cl}^-$  kanalą, įvyksta ląstelės depoliarizacija (stimuliacija). GABA sukelta depoliarizacija yra svarbi tinkamų stimuliuojančių sinapsių susidarymui, žievės neuronų dendritų

formavimuisi. Bręstant nervų sistemai, chloro jonų koncentracija ląstelėse mažėja ir GABA sukelia skirtingą efektą – pašalinus neigiamus jonus iš ląstelės ji hiperpoliarizuojasi, GABA funkcija pasikeičia iš stimuliacinės į inhibitorinę. Šis pokytis atsitinka dėl  $K^+/Cl^-$  kotransporterio ekspresijos, kuri prasideda gimimo metu. Manoma, kad nuo GABA priklausomas stimuliacinis poveikis svarbus sinapsių plastiškumui ir veikia neuronų tinklų susidarymą. Kadangi GABA svarbus skirtingose ląstelių vystymosi fazėse, bet koks gabaerginės funkcijos sutrikdymas brendimo metu gali paveikti neuronų jungčių susidarymą, neuronų plastiškumą ir pakeisti nervų sistemos organizaciją [6].

#### **5. GABA ir glutamato receptorių moduliacijos reikšmė smegenų vystymuisi**

Tobulėjant medicininėms technologijoms ir daugėjant prenatalinių ir ankstyvų postnatalinių intervencijų, didėja vaisių ir mažų vaikų kiekis, kurie patiria anestezijos poveikį smegenų vystymosi metu. Šis periodas žmonėms trunka nuo šešto nėštumo mėnesio iki apytiksliai trečių postnatalinio periodo metų. Nors anestetikų naudojimas yra reikalingas, yra keliamas klausimas dėl jų pasekmių nervų sistemos vystymuisi, ypač esant ilgai sedacijai ar bendrajai anestezijai. Dažniausiai naudojami preparatai, tokie kaip benzodiazepinai, barbitūratai, propofolis, ketaminas ir inhaliuojami anestetikai (isofluranas, sevofluranas) veikia potencijuodami GABA receptorių aktyvumą, blokuodami NMDA receptorių, veikdami abu receptorių, ar per papildomus mechanizmus. Kadangi tiek NMDA, tiek GABA receptoriai turi didelę reikšmę neuronų tinklų susidarymui, smegenų plastiškumui, sinapsių karpymui, pritaikius medikamentus, veikiančius šiuos receptorių, kyla rizika sutrikdyti smegenų

vystymosi metu vykstančius procesus [6]. Manoma, kad NMDA receptoriai yra  $N_2O$  ir ketamino taikiniai. Šių anestetikų naudojimas eksperimentinėms pelėms smegenų augimo spurto metu akseleruoja apoptozę. Ketaminas taip pat slopina dendritų medžio šakojimąsi ląstelių kultūrose. Tačiau manoma, kad GABA receptorių potenciacija yra pagrindinis daugumos anestetikų, įskaitant propofolį, etomidatą, tiopentalį, midazolamą ir sevofluraną, veikimo mechanizmas. Jų panaudojimas anestezijos indukcijai ir palaikymui yra universalus visame pasaulyje. Kaip ir NMDA receptorių antagonizmas, GABA potenciacija akseleruoja apoptozę besivystančiose eksperimentinių gyvūnų smegenyse. Taip pat žinoma, kad NMDA antagonistų ir GABA mimetikų skyrimas vienu metu sukelia didesnę apoptozę ir jos sąlygotus mokymosi sutrikimus, nei monoterapija [8]. Pokyčių pasireiškimas yra tiesiogiai priklausomas nuo amžiaus, dozės ir ekspozicijos trukmės. [3]

#### **6. Klinikinių tyrimų perspektyvos**

Jau yra žinoma, kad eksperimentiniams gyvūnams, NMDA antagonistai ir GABA agonistai sukelia ilgalaikes neuroanatomines pasėkmes. Panašu, kad vienkartinė, trumpa anestezija nesukelia reikšmingų neurologinių pakitimų, tačiau ilgesnė, pakartotinė anestezija, ar ilga sedacija galėtų sukelti neurologinius pakitimus [9]. Interpretuoti klinikinių tyrimų su žmonėmis duomenis yra kur kas sunkiau dėl iškreipiančiųjų veiksnių (angl. confounding). Sveikatos problemų neturintys vaikai nepatiria ilgos (virš 3 valandų) anestezijos ar pakartotinių procedūrų, kurioms reikalinga bendroji anestezija. Neišnešiotų ar turinčių širdies ydas vaikų smegenys gali būti pažeistos dėl kitų priežasčių, tokių kaip hipoksija, dar prieš ekspoziciją anestezijai [10]. Taip pat, gyvenimo eigoje yra daugybė veiksnių (pvz., genetika,

gretutinės ligos, socioekonominiai, demografiniai faktoriai, hipotenzija operacijos metu ir kiti) turinčių įtakos smegenų vystymuisi. Esamos studijos, tiriančios anestetikų neurotoksiškumo kliniškes išėtis žmonėms, kol kas nėra suformavę aiškių išvadų. Nors kai kurios retrospektyvios studijos demonstruoja asociaciją tarp anestezijos ekspozicijos jauname amžiuje ir neurokognityvinių deficitų, pagrindinių klinikinių studijų rezultatai yra priešaringi [11]. PANDA klinišinio tyrimo metu buvo siekiama išsiaiškinti vienkartinės ekspozicijos anestezijai įtaką psichometrinių testų rezultatams. Buvo lyginami brolių/seserų porų psichometrinių testų skirtumai, kai vienas iš poros buvo patyręs vienkartinę anesteziją iki 36 mėnesių. Vėlesnės vaikystės etapu atlikti neurokognityviniai testai neparodė statistiškai reikšmingo skirtumo tarp vaikų, kurie turėjo ekspoziciją anestezijai ir vaikų, kurie neturėjo [12]. MASK tyrimas vertino vaikų iki 3 metų, turėjusių ekspoziciją anestezijai, IQ. Buvo pastebėta, kad vienkartinę anesteziją patyrę vaikai neturėjo statistiškai reikšmingo IQ pakitimo. Vaikai turėję daugkartinę ekspoziciją anestezijai, pasižymėjo statistiškai reikšmingu smulkiosios koordinacijos sumažėjimu bei ilgesniu užduoties atlikimo laiku [13]. Tačiau, pritaikius OBT (angl., open test battery) užduočių testą, statistiškai reikšmingo skirtumo tarp vaikų grupių nebuvo rasta. [14]. GAS klinišinio tyrimo metu buvo lyginamos neurokognityvinės <60 savaičių postmenstruacinio amžiaus išėtis; buvo atliekama kirkšnies išvaržos operacija spinalinėje arba bendrojoje neįautroje. Atliktų neurokognityvinių testų rezultatai 5 metų amžiaus sulaukusiems vaikams neturėjo statistiškai reikšmingo skirtumo tarp vaikų grupių [15].

Tyrimai skiriasi savo metodika ir yra sunkiai palyginami. Viena iš priežasčių yra sunkumas suformuojant tyrimo planą, kurio išėtis kiek įmanoma mažiau veiktų išoriniai iškraipantys

veiksniai. Klinišiniai atsitiktinių imčių dvigubai akli tyrimai nėra etiški šiuo atveju, todėl yra siūloma taikyti Mendelėjinės randomizacijos tyrimo modelį, kuris padėtų sumažinti iškraipiančiųjų veiksnių poveikį ir parodyti priežastinį ryšį tarp modifikuojamos anestezijos ekspozicijos ir neurologinių paciento išėčių [9]. Kadangi tokius tyrimus atlikti sunku, yra išleistos gairės ikiklinikinių tyrimų atlikimui ir rezultatų aprašymui. Išsamūs ir standartizuoti ikiklinikiniai tyrimai gali padėti pagilinti neurotoksiškumo mechanizmų suvokimą ir pagerinti pacientų klinišinę priežiūrą [16].

#### Literatūros šaltiniai

- [1] Stiles J, Jernigan TL. The Basics of Brain Development 2010:327–48. doi:10.1007/s11065-010-9148-4.
- [2] Johnson MH. FUNCTIONAL BRAIN DEVELOPMENT IN HUMANS 2001;2.
- [3] Vutskits L, Davidson A. Update on developmental anesthesia neurotoxicity 2017:337–42. doi:10.1097/ACO.0000000000000461.
- [4] Jiang X, Nardelli J. PT SC. Neurobiol Dis 2015. doi:10.1016/j.nbd.2015.07.007.
- [5] Neniskyte U, Gross CT. Errant gardeners : glial-cell- dependent synaptic pruning and neurodevelopmental disorders. Nat Publ Gr 2017;18:658–70. doi:10.1038/nrn.2017.110.
- [6] Herlenius EAP, Institutet K. Neurotransmitters and neuromodulators during brain development 2014.
- [7] Wu X, Fu Y, Knott G, Lu J, Cristo G Di, Huang ZJ. GABA Signaling Promotes Synapse Elimination and Axon Pruning in

- Developing Cortical Inhibitory Interneurons 2012;32:331–43. doi:10.1523/JNEUROSCI.3189-11.2012.
- [8] Henschel O, Gipsen KE, Bordey A. NIH Public Access 2008;7:211–24.
- [9] Walkden GJ, Pickering AE, Gill H. Assessing Long-term Neurodevelopmental Outcome Following General Anesthesia in Early Childhood: Challenges and Opportunities 2019;128:681–94. doi:10.1213/ANE.0000000000004052.
- [10] Engla NEW, Journal ND. New engla nd journal 2017:1–3.
- [11] Mccann ME, Soriano SG. Does general anesthesia affect neurodevelopment in infants and children? 2019:1–12. doi:10.1136/bmj.l6459.
- [12] Pharmaceuticals C, Pharmaceuticals M, Bernier R, Brooks-gunn J, Card KK, Davis P, et al. HHS Public Access Author manuscript 2017;315:2312–20. doi:10.1001/jama.2016.6967. Corresponding.
- [13] Gleich SJ, Wilder RT, Sprung J. HHS Public Access. vol. 129. 2019. doi:10.1097/ALN.0000000000002232. Neuropsychological.
- [14] Warner DO, Chelonis JJ, Paule MG, Frank RD, Lee M, Zaccariello MJ, et al. Performance on the Operant Test Battery in young children exposed to procedures requiring general anaesthesia : the MASK study. Br J Anaesth 2019;122:470–9. doi:10.1016/j.bja.2018.12.020.
- [15] Mccann ME, Graaff JC De, Dorris L, Disma N, Withington D, Bell G, et al. Neurodevelopmental outcome at 5 years of age after general anaesthesia or awake-regional anaesthesia in infancy ( GAS ): an international , multicentre , randomised , controlled equivalence trial 2019;393. doi:10.1016/S0140-6736(18)32485-1.
- [16] Chinn GA, Pearn ML, Vutskits L, Mintz CD, Loepke AW, Lee JJ, et al. Standards for preclinical research and publications in developmental anaesthetic neurotoxicity : expert opinion statement from the SmartTots preclinical working group. Br J Anaesth 2020:1–9. doi:10.1016/j.bja.2020.01.011.