

УДК 57.045:576.33

Т. А. Борисова, Н. В. Крысанова, Н. Г. Гиммельрейх

Институт біохімії ім. А. В. Палладіна НАН України, Київ

**Изменение накопления L-[<sup>14</sup>C]-глутамата  
нервными окончаниями мозжечка  
и больших полушарий головного мозга крыс  
в условиях моделированной гипергравитации**

*Найшла до редакції 18.12.01*

Вивчено вплив гіпергравітаційного стресу на процес високоафінного Na<sup>+</sup>-залежного поглинання L-[<sup>14</sup>C]-глутамату синапсосомами мозочка та великих півкуль головного мозку щурів. Проаналізовані кінетичні параметри ( $K_M$  і  $V_{max}$ ) процесу для тварин, що утримувалися в звичайних земних умовах і тварин після гіпергравітаційного навантаження. Показано, що для синапсосом обох відділів головного мозку величини позірної  $K_M$  майже однакові в обох групах дослідних тварин і дорівнюють в мозочку  $18.2 \pm 7.6$  мкМ та  $23.3 \pm 6.9$  мкМ, а у великих півкулях  $10.7 \pm 2.5$  мкМ та  $6.7 \pm 1.5$  мкМ у контролі та після впливу гіпергравітації відповідно, що свідчить про відсутність впливу стресу гравітаційної природи на спорідненість мембранних транспортерів до глутамату. Максимальна швидкість накопичення глутамату синапсосомами ( $V_{max}$ ) знижувалася після гіпергравітаційного навантаження з  $9.6 \pm 3.9$  нмоль/хв/мг білка до  $7.4 \pm 2.0$  нмоль/хв/мг білка в синапсосомах мозочка, і з  $12.5 \pm 3.2$  нмоль/хв/мг білка до  $5.6 \pm 0.9$  нмоль/хв/мг білка в синапсосомах півкуль головного мозку. Під впливом гіпергравітаційного навантаження рівень накопичення синапсосомами L-[<sup>14</sup>C]-глутамату значно знижується в мозочку, але не в півкулях головного мозку. Обговорюються можливі механізми впливу гіпергравітації на процес накопичення глутамату.

Изучение особенностей и динамики адаптации живых систем к условиям измененной силы тяжести, наряду с выявлением эволюционной роли гравитации в развитии и функционировании организмов на Земле, создает возможность более полно исследовать основные биологические механизмы [8], преследует ряд конкретных практических задач нормализации процессов жизнедеятельности, оптимизации биологических систем во время длительного космического полета.

К настоящему времени изучение природы и закономерностей структурно-функциональных перестроек, происходящих в условиях измененной силы тяжести, проведено на большом количестве разнообразных объектов от микроорганизмов до млекопитающих. Изменения, появляющиеся на уровне организма в длительном космическом полете, очевидно, связаны с нарушением регуляторных меха-

низмов, контролируемых на клеточном уровне.

Установлено достоверное снижение содержания белка в цитоплазме мотонейронов спинного мозга крыс, в крупных нервных клетках спинномозговых узлов, а также уменьшение содержания водорастворимых белков в структурах серого и белого вещества спинного мозга и межпозвоночных узлов в условиях измененной гравитации [1].

В работе [13] была проведена сравнительная оценка некоторых морфологических показателей функционального состояния нейрогипофиза у крыс, подвергшихся воздействию микрогравитации и искусственной гравитации в течение 18.5 дней на борту биоспутника «Космос-936». Как показал анализ морфологических данных, результатом продолжительного воздействия микрогравитации является значительное уменьшение числа нейросекреторных частиц, уменьшение объема ядра. Было сделано

предположение о снижении уровня функциональной активности гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы в условиях невесомости.

Получены результаты, что микрогравитация индуцирует структурные изменения в нервной ткани млекопитающих, развитие гипоактивности нейронов. Гипергравитация также оказывает значительное влияние на нервные клетки. Выдвинута гипотеза, что длительное пребывание в условиях искусственной гравитации приводит к изменениям, результатом которых является потеря химической активности нейронов [6]. Морфологические исследования, проведенные на аксонах, выявили изменение количества синаптических везикул в нервных окончаниях и дегенеративные изменения в цитоскелете [4, 5]. В работе [11] показано, что при хронических гравитационных нагрузках происходят значительные изменения в цитоплазматических органеллах нейронов, нарушается секреторный процесс, наблюдается отмирание части нейронов.

Как видно из вышеизложенного, немногочисленные литературные источники содержат результаты исследований (в основном морфологического характера) влияния микро- и гипергравитации на процесс передачи нервного импульса, от которого в значительной мере зависит нормальное функционирование организма. В настоящее время вопрос о влиянии гравитации непосредственно на механизм нейросекреции совершенно не исследован.

Известно, что одним из основных возбуждающих нейромедиаторов в организме животных является L-глутаминовая кислота. Ткань мозга обладает значительной способностью аккумулировать глутамат, однако лишь незначительная часть этого глутамата в норме находится во внеклеточном пространстве. За счет работы глутаматных транспортеров, локализованных в плазматической мембране нейронов и глиальных клеток, происходит удаление глутамата из внеклеточного пространства, и осуществляется длительное поддержание низкой нетоксичной концентрации глутамата. Движущей силой процесса активного накопления глутамата являются трансмембранные градиенты концентраций ионов в клетке.

Клонировано пять подтипов натрий-зависимых высокоаффинных транспортеров: GLAST (EAAT1), GLT (EAAT2), EAAC (EAAT3), EAAT4 и EAAT5 [7]; 50–60 % аминокислотных последовательностей этих белков идентичны.

Изменения в процессе функционирования глутаматных транспортеров могут привести к модуляции нейротрансмиссии. Известно, что при нарушениях регуляции концентрации глутамата в синаптической

щели возникает хроническое возбуждение нейрона [15], что приводит к «глутаматной нейротоксичности». Нарушения, возникающие в процессе активного поглощения возбуждающих нейромедиаторов, могут быть вовлечены в патогенез нейродегенеративных болезней, таких как болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера, шизофрения, эпилепсия и др. [10]. При мозговых травмах и ишемии также наблюдаются нарушения процесса поглощения глутамата [14].

Как уже было отмечено, изменение гравитационных условий индуцирует структурные изменения в нервной ткани млекопитающих. Однако имеющиеся сведения не дают возможности определить, какие отделы головного мозга в большей степени подвергаются изменениям при воздействии стресса гравитационной природы, а также модуляция каких этапов передачи нервного импульса приводит к нарушению процесса в целом. Изучение этих вопросов ведет к определению роли отделов головного мозга и вклада различных этапов процесса нейросекреции в функциональную пластичность нервной системы.

Наше исследование посвящено анализу влияния стресса гравитационной природы на процесс активного накопления L-глутамата синапсосомами мозжечка и больших полушарий головного мозга крыс.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гипергравитационный стресс у половозрелых самцов крыс Wistar, весом 100–120 г, моделировали центрифугированием (диаметр центрифуги 50 см) в специальных контейнерах в течение 1 ч при 10g. Синапсосомы из головного мозга крыс выделяли сразу после окончания гравитационной нагрузки. В качестве контроля использовали животных, содержащихся в обычных земных условиях.

**Получение синапсосом.** В опытах использовали синапсосомы, выделенные из больших полушарий (одно животное на опыт) и мозжечка (четыре животных на опыт) декапитированных крыс дифференциальным центрифугированием и центрифугированием в градиенте плотности фикола-400, применяя метод Котмана [3] с небольшими модификациями: раствор сахарозы для приготовления градиента фикола содержал 5мМ Hepes-NaOH и 0.2 мМ ЭДТА, pH 7.4. Синапсосомальную фракцию, полученную при фракционировании в градиенте фикола, разводили 10 объемами 0.32 М сахарозы, 5 мМ Hepes-NaOH, pH 7.4 и центрифугировали при 20000g в течение 20 мин. Осадок ресуспендировали на льду в стандартном солевом

растворе следующего состава: 126 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1.0 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 мМ Hepes, pH 7.4, 10 мМ d-глюкоза. Полученную суспензию синапсом (концентрация белка 4 мг/мл) использовали в экспериментах в течение 2—4 ч после получения. Ca<sup>2+</sup>-содержащая среда состояла из стандартного солевого раствора и 2 мМ CaCl<sub>2</sub>. Все процедуры проводили при 0 °С. Концентрацию белка определяли согласно работе [9].

**Накопление L-глутамата.** При определении активного накопления L-глутамата суспензию синапсом (из расчета 250 мкл суспензии на каждое измерение, концентрация белка 250 мкг/мл) преинкубировали 8 мин при 37 °С в стандартном Ca<sup>2+</sup>-содержащем буфере. Затем добавляли смесь немеченного L-глутамата и меченного радиоактивной меткой L-[<sup>14</sup>C]-глутамата (251 мКи/ммоль) в разных соотношениях от 10:1 до 50:1 соответственно. Аликвоты суспензии синапсом (250 мкл, 63 мкг белка) отбирали через 15 и 45 с и фильтровали на фильтрах «Whatman GF/C» (Англия). Фильтры быстро промывали охлажденным солевым раствором, помещали на 1 ч во флаконы со 100 мкл 10 % SDS и измеряли радиоактивность в сцинтилляционной жидкости ЖС-103 на счетчике радиоактивности «Tracor Analytic Delta 300». Количество поглощенного глутамата определяли, используя данные по активности меченого препарата (251 мКи/ммоль). Неспецифическое связывание глутамата измеряли путем инкубирования с синапсом [L-<sup>14</sup>C]-глутамата при 0 °С. Для расчета уровня активного накопления глутамата значение неспецифического связывания вычиталось из полученных данных. Анализ частей равнобочной гиперболы проводили с помощью программы Microcal Origin.

**Выход L-глутамата.** Для определения уровня спонтанного выхода L-[<sup>14</sup>C]-глутамата из синапсом, суспензию (концентрация белка 4 мг/мл) в стандартном Ca<sup>2+</sup>-содержащем буфере преинкубировали 10 мин при 37 °С, затем добавляли 500 нМ L-[<sup>14</sup>C]-глутамата и инкубировали еще 10 мин при 37 °С. После инкубирования с L-[<sup>14</sup>C]-глутаматом суспензию разводили 10 объемами охлажденного стандартного солевого Ca<sup>2+</sup>-содержащего раствора, центрифугировали 10 мин при 4000g, затем осадок ресуспендировали в том же буфере при 0 °С и использовали в эксперименте (концентрация белка 4 мг/мл). Суспензию синапсом разводили стандартным Ca<sup>2+</sup>-содержащим буфером из расчета 250 мкг белка синапсом в 250 мкл суспензии на каждое измерение, преинкубировали 10 мин при 37 °С. Для определения уровня накопления L-[<sup>14</sup>C]-глутамата отбирали аликвоты суспензии си-

напсом (250 мкл, 250 мкг белка синапсом) и фильтровали. Эксперименты по базальному выходу L-[<sup>14</sup>C]-глутамата проводили следующим образом: суспензию синапсом инкубировали 6 мин при той же температуре. Аликвоты суспензии синапсом (250 мкл, 250 мкг белка синапсом) отбирали и фильтровали на фильтрах «Whatman GF/C». Фильтры быстро промывали охлажденным солевым раствором, помещали на 1 ч во флаконы со 100 мкл 10 % SDS и измеряли радиоактивность в сцинтилляционной жидкости ЖС-103 на счетчике радиоактивности «Tracor Analytic Delta 300».

По результатам экспериментов вычислялись средние значения параметров  $K_M$  и  $V_{max}$  и их стандартные отклонения. Статистический анализ данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента (уровень значимости 0.05).

В экспериментах были использованы фиколл-400 (Serva), Hepes (Sigma), ЭДТА (Calbiochem), d-глюкоза (Sigma), L-глутамат (Sigma), L-[<sup>14</sup>C]-глутамат (Amersham), SDS (Fluka), NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> (о. с. ч. Реахим), сцинтилляционная жидкость ЖС-103 (Реахим).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синапсомы (отделенные от аксонов нервные окончания) обладают всеми характеристиками интактного нервного окончания: мембранным потенциалом, способностью к активному накоплению нейромедиаторов и освобождению нейромедиаторов при деполяризации мембраны. Основная задача исследования состояла в сравнительном анализе характеристик процесса высокоаффинного активного Na<sup>+</sup>-зависимого поглощения глутамата, протекающего в обычных земных условиях (К — контроль) и в условиях моделированной гипергравитации (ГГ).

Для определения значений кинетических характеристик  $K_M$  и  $V_{max}$  ( $K_M$  — константа Михаэлиса,  $V_{max}$  — максимальная скорость) поглощения глутамата К- и ГГ-синапсомы, полученные из мозжечка крыс, инкубировали с L-[<sup>14</sup>C]-глутаматом / L-глутаматом в различных концентрациях. Был выбран диапазон концентраций L-глутамата от 5 до 75 мкмоль.

На рис. 1, а показана зависимость количества поглощенного глутамата ГГ-синапсомы от времени инкубации при разных концентрациях глутамата в среде. Неспецифическое связывание глутамата составляло не более 5 % от общего количества захваченной метки. Данные, полученные при инкубации синапсомы с возрастающими концентра-

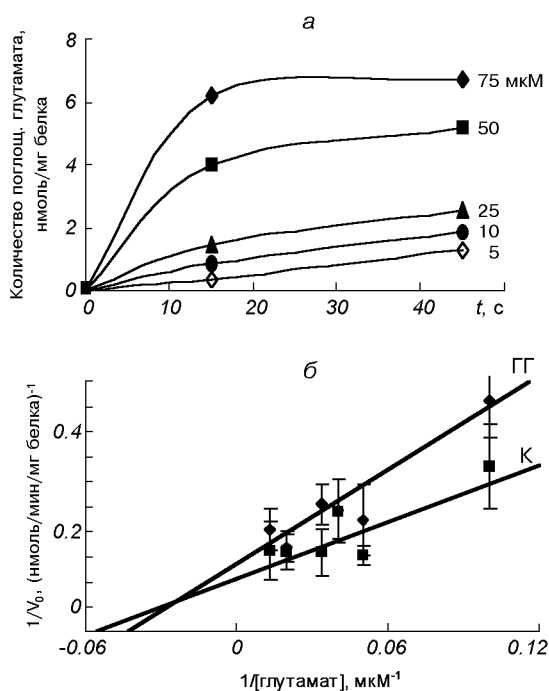


Рис. 1. Кинетический анализ активного накопления L-[<sup>14</sup>C]-глутамата К- и ГГ-синапсами мозжечка крыс: а — зависимость количества поглощенного L-[<sup>14</sup>C]-глутамата ГГ-синапсами от времени инкубации при разных концентрациях глутамата в среде; б — график двойных обратных величин Лайнуивера—Бэрка зависимости начальной скорости накопления L-[<sup>14</sup>C]-глутамата от концентрации глутамата в среде инкубации

циями L-[<sup>14</sup>C]-глутамата / L-глутамата, позволили установить гиперболическую зависимость начальной скорости поглощения от концентрации глутамата для К- и ГГ-синапсом. Определение значений кажущейся  $K_M$  по данным измерения начальной скорости процесса накопления при различных концентрациях глутамата проводили методом двойных обратных величин Лайнуивера—Бэрка (рис. 1, б). Значения  $K_M$  составили  $18.2 \pm 7.6$  мкМ для К-синапсом и  $23.3 \pm 6.9$  мкМ для ГГ-синапсом; их разница статистически незначима. Практически одинаковые величины кажущихся  $K_M$  свидетельствовали об отсутствии в предложенной модельной системе влияния стресса гравитационной природы на сродство мембранных транспортеров к глутамату в мозжечке крыс.

Значение кажущейся  $K_M$  в контрольных экспериментах не отличалось от литературных данных. Результаты исследования [12] свидетельствуют о том, что значение  $K_M$  процесса высокоаффинного  $\text{Na}^+$ -зависимого поглощения L-глутамата для си-

напсом, выделенных из мозжечка крыс, составляет 15 мкМ.

Аналогичные исследования, проведенные на больших полушариях мозга крыс, показали, что значения кажущихся  $K_M$  для синапсом больших полушарий составили  $10.7 \pm 2.5$  мкМ (К),  $6.7 \pm 1.5$  мкМ (ГГ) и статистически не различаются. Следовательно, воздействие ГГ-стресса не приводит к изменению сродства транспортеров к глутамату как в мозжечке, так и в больших полушариях.

Видно, что сродство транспортеров к глутамату в мозжечке несколько отличается от сродства в больших полушариях как в контроле, так и после воздействия ГГ-стресса. Это, по-видимому, связано с региональной гетерогенностью экспрессии различных типов транспортеров, имеющих различные кинетические характеристики. Мозжечок, например, специфически обогащен типом транспортера GLAST. Согласно работе [7] значение кажущейся  $K_M$  для этого типа транспортера варьирует от 62 до 77 мкМ. GLT 1 более характерен для полушарий, чем для мозжечка, а величина кажущейся  $K_M$  для GLT 1 колеблется от 2 до 10 мкМ. Вопрос о месте локализации различных типов транспортеров окончательно не выяснен и в настоящее время активно изучается.

При определении максимальной скорости  $V_{\max}$  накопления L-[<sup>14</sup>C]-глутамата / L-глутамата контрольными и ГГ-синапсами мозжечка (рис. 1, б) были получены следующие значения:  $V_{\max} = 9.6 \pm 3.9$  для К-синапсом нмоль/мин в расчете на мг белка синапсом и  $7.4 \pm 2.0$  нмоль/мин/мг белка для ГГ-синапсом. Разница между ними статистически незначима. Наблюдалась значительная тенденция к уменьшению максимальной скорости накопления глутамата в препарате синапсом мозжечка крыс после стресса гравитационной природы. Однако аналогичные исследования, проведенные на больших полушариях мозга крыс, показали, что для К- и ГГ-синапсом больших полушарий разница между значениями  $V_{\max}$  являлась статистически значимой  $12.5 \pm 3.2$  нмоль/мин в расчете на 1 мг белка (К),  $5.6 \pm 0.9$  нмоль/мин/мг белка (ГГ) ( $P \leq 0.05$ ,  $n = 7$  и  $9$ ). Таким образом, ГГ-стресс вызывал уменьшение максимальной скорости накопления глутамата в больших полушариях.

Изменение максимальной скорости накопления глутамата может быть связано с нарушением энергетического баланса клетки, трансмембранных градиентов концентраций ионов в клетке, которые являются движущей силой процесса захвата. Активность  $\text{Na}^+$ -зависимых транспортеров регулируется рядом факторов, а ее изменение отражает фун-

кциональные модуляции в системе вторичных мессенджеров, киназ, фосфатаз и т. д. Недостаток высокоэнергетических фосфатов, аккумуляция токсичных метаболитов или эффект эндогенных регуляторных факторов могут вызывать функциональные, но обратимые нарушения процесса активного накопления. Уменьшение скорости накопления L-[<sup>14</sup>C]-глутамата может привести к ограниченной глутаматной нейротоксичности, хроническому возбуждению нейрона.

Изучали накопление глутамата синапсосомами больших полушарий и мозжечка контрольных животных и животных после ГГ-стресса после 10 мин инкубации в присутствии 500 нМ L-[<sup>14</sup>C]-глутамата (рис. 2). В норме синапсосомы больших полушарий накапливали  $6.40 \pm 0.57$  нмоль L-[<sup>14</sup>C]-глутамата в расчете на мг белка синапсосом, а ГГ-синапсосомы больших полушарий  $-5.20 \pm 0.66$  нмоль/мг белка. Разница не являлась статистически значимой. Наблюдалась тенденция к уменьшению уровня накопления L-[<sup>14</sup>C]-глутамата синапсосомами больших полушарий после стресса гравитационной природы. Контрольные синапсосомы мозжечка поглощали  $4.45 \pm 0.39$  нмоль L-[<sup>14</sup>C]-глутамата в расчете на мг белка синапсосом, а синапсосомы, полученные из мозжечка животных после ГГ стресса —  $3.10 \pm 0.26$  нмоль/мг белка. Разница являлась статистически значимой ( $P \leq 0.05$ ,  $n = 7$  и  $15$ ). Наблюдалось уменьшение накопления L-[<sup>14</sup>C]-глутамата синапсосомами мозжечка после гипергравитационного стресса.

Видно, что мозжечок в значительно большей степени, чем большие полушария, подвержен действию стресса гравитационной природы. Это может быть связано с особой ролью мозжечка в координации движений, ориентации в пространстве. В условиях модельной системы, именно мозжечок подвергался значительным нагрузкам. Возможно также, что мозжечок менее устойчив к воздействию исследуемого стрессового фактора, и гипоксическое состояние, которое, по-видимому, развивалось у экспериментальных животных [2, 11], приводило к более значительным нарушениям процесса транспорта глутамата в мозжечке, чем в больших полушариях.

Из рис. 2 видно, что уровень накопления L-[<sup>14</sup>C]-глутамата контрольными синапсосомами больших полушарий и мозжечка отличался, и эта разница статистически значима ( $P \leq 0.05$ ,  $n = 12$  и  $7$ ). В норме уровень накопления глутамата синапсосомами больших полушарий почти в полтора раза выше, чем синапсосомами мозжечка. После ГГ-стресса уровень накопления L-[<sup>14</sup>C]-глутамата синапсосомами больших полушарий в 1.7 раза вы-

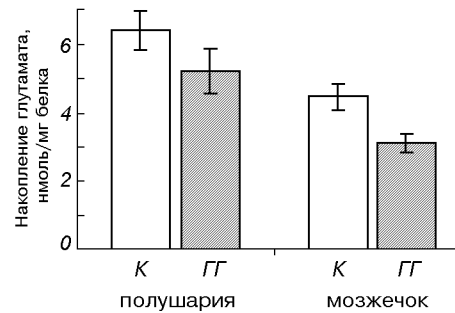


Рис. 2. Накопление L-[<sup>14</sup>C]-глутамата синапсосомами из больших полушарий головного мозга и мозжечка животных (К — контрольные животные, ГГ — после стресса). Использованы данные по 17 препаратам синаптических везикул

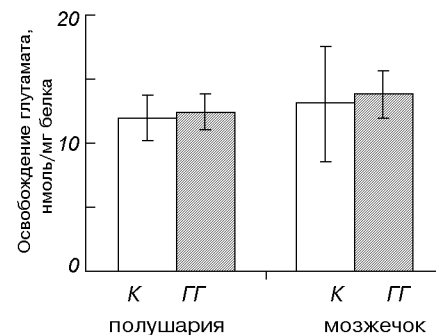


Рис. 3. Нестимулированное освобождение L-[<sup>14</sup>C]-глутамата из К- и ГГ-синапсосом больших полушарий и мозжечка крыс. Использованы данные по 17 препаратам синаптических везикул

ше, чем синапсосомами мозжечка. Разница статистически значима ( $P \leq 0.05$ ,  $n = 12$  и  $15$ ). Низкий уровень накопления глутамата мозжечком по сравнению с большими полушариями, по-видимому, связан с различием кинетических характеристик транспортеров этих отделов мозга (рис. 1, б).

Необходимо отметить, что при этом уровень спонтанного выхода L-[<sup>14</sup>C]-глутамата из синапсосом, характеризующий состояние их плазматической мембраны, не изменялся. На рис. 3 представлен уровень нестимулированного освобождения L-[<sup>14</sup>C]-глутамата из К- и ГГ-синаптических везикул больших полушарий и мозжечка. Суспензия синапсосом оставалась стабильна в течение исследуемого временного интервала как в случае контрольных, так и ГГ-синапсосом. За 6 мин наблюдалось нестимулированное освобождение  $12.0 \pm 2.3$  % (К) и  $12.5 \pm 2.7$  % (ГГ) захваченного L-[<sup>14</sup>C]-глутамата синапсосомами больших полушарий, и  $13.0 \pm 4.5$  % (К) и  $13.7 \pm 1.8$  % (ГГ) синапсосомами

мозжечка. ГГ-стресс не приводил к изменению уровня базального вытекания L-[<sup>14</sup>C]-глутамата из синапсом как больших полушарий, так и мозжечка.

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что гипергравитационная нагрузка влияет на процесс накопления нейромедиатора нервными окончаниями головного мозга животных. Возникают изменения в процессе функционирования глутаматных транспортеров. Можно предположить, что после воздействия гипергравитационного стресса возникают нарушения и на другом этапе передачи нервного импульса, т. е. при освобождении нейромедиаторов в синаптическую щель. Несомненный интерес представляет исследование распределения нейромедиатора между везикулированным и цитоплазматическим пулами после ГГ-стресса. Эти исследования позволят оценить вклад этого этапа нейросекреции в функциональную пластичность синапса.

Работа выполнена при поддержке НТЦУ (NN-06, NASA, НККАУ).

- Газенко О. Г., Генин А. М., Ильин Е. А. и др. Адаптация к невесомости и ее физиологические механизмы // Изв. АН СССР.—1980.—1.—Р. 5—18.
- Черниговский В. Н. Проблемы космической биологии. — М.: Наука, 1971.—15.—355 с.
- Cotman C. W. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions // *Methods Enzymol.*—1974.—31.—Р. 445—452.
- D'Amelio F., Fox R. A., Wu L. C., Daunton N. G. Quantitative changes of GABA-immunoreactive cells in the hindlimb representation of the rat somatosensory cortex after 14-day hindlimb unloading by tail suspension // *J. Neurosci Res.*—1996.—44, N 6.—Р. 532—539.
- D'Amelio F., Wu L. C., Fox R. A., et al. Hypergravity exposure decreases gamma-aminobutyric acid immunoreactivity in axon terminals contacting pyramidal cells in the rat somatosensory cortex: a quantitative immunocytochemical image analysis // *J. Neurosci Res.*—1998.—15, N 53.—Р. 135—142.
- Fox R. A. Effects of Artificial Gravity: Central Nervous System Neurochemical Studies // *NASA Taskbook.*—1997.—Р. 619—620.
- Gegelashvili G., Schousboe A. Cellular Distribution and Kinetic Properties of Affinity Glutamate Transporters // *Brain Res. Bull.*—1998.—45, N 3.—Р. 233—238.
- Hughes-Fulford M. Altered cell function in microgravity // *Exp. Gerontol.*—1991.—26, N 2-3.—Р. 247—256.
- Larson E., Howlett B., Jagendorf A. Artificial reductant

enhancement of the Lowry method for protein determination // *Anal. Biochem.*—1986.—155.—Р. 243—248.

- Lipton S. A., Rosenberg P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders // *New Engl. J. Med.*—1994.—330.—Р. 613—662.
- Paschenko P. S., Sukhoterin A. F. The structural organization of the normal rat area postrema and under conditions of chronic exposure to gravitational loads // *Morfologia.*—2000.—117.—Р. 36—41.
- Rao V. L., Murthy C. R. K. Uptake, release and metabolism of glutamate and aspartate by rat cerebellar subcellular preparations // *Biochem. Mol. Biol. Int.*—1993.—29.—Р. 711—717.
- Savina E. A., Alekseev E. I. Functional state of the posterior lobe of rats exposed aboard the biosatellite «Cosmos-936» // *Arch. anat. Gistol Embriol.*—1980.—78, N 1.—Р. 62—68.
- Siesjo B. K. Basic mechanisms of traumatic brain damage // *Ann. Emergency Med.*—1993.—22.—Р. 959—969.
- Vatassery G. T., Lai J. C. K., Smith W. E., Quach H. T. Aging is associated with a decrease in synaptosomal glutamate uptake and an increase in the susceptibility of synaptosomal vitamine E to oxidative stress // *Neurochemical Res.*—1998.—23.—Р. 121—125.

#### L-[<sup>14</sup>C]-GLUTAMATE UPTAKE BY NERVE TERMINALS FROM RAT CEREBELLUM AND CEREBRAL HEMISPHERES UNDER ARTIFICIAL HYPERGRAVITY

T. A. Borisova, N. V. Krisanova, N. H. Himmelreich

Using synaptosomes from rat cerebellum and cerebral hemispheres, we investigated the effect of hypergravity on the kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{max}$  of the  $Na^+$ -dependent, high-affinity L-[<sup>14</sup>C]-glutamate transport activity. The hypergravity stress was created by centrifugation of rats for 1 hour at 10g. We observed no differences in  $K_m$  values for cerebellum and cerebral hemisphere synaptosomes between the control rats —  $18.2 \pm 7.6 \mu M$  (cerebellum),  $10.7 \pm 2.5 \mu M$  (cerebral hemispheres) and the animals exposed to hypergravity —  $23.3 \pm 6.9 \mu M$  (cerebellum),  $6.7 \pm 1.5 \mu M$  (cerebral hemispheres). The similarity of this parameter for the two groups of animals showed that the affinity of glutamate transporter to substrate in cerebellum and cerebral hemispheres was not sensitive to hypergravity stress. The maximal velocity of L-[<sup>14</sup>C]-glutamate uptake ( $V_{max}$ ) diminished for cerebellum synaptosomes from  $9.6 \pm 3.9$  nmol/min/mg of protein in the control group to  $7.4 \pm 2.0$  nmol/min/mg of protein in the animals exposed to hypergravity stress and for cerebral hemisphere synaptosomes from  $12.5 \pm 3.2$  nmol/min/mg of protein to  $5.6 \pm 0.9$  nmol/min/mg of protein, respectively. It was also shown that the hypergravity effect on the level of L-[<sup>14</sup>C]-glutamate uptake was different for cerebellum and cerebral hemisphere synaptosomes. Only for cerebellum synaptosomes, a significant decrease in the level of L-[<sup>14</sup>C]-glutamate uptake was observed. Possible mechanisms of the attenuation of glutamate transporter activity are discussed.