

УДК 57.045:576.33

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

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

## Моделированная гравитация и глутаматэргическая передача в больших полушариях мозга

---

Вивчено вплив модельованої гіпергравітації на процес звільнення L-[<sup>14</sup>C]глутамату із синапсом (відділені від аксонів нервові закінчення) великих півкуль головного мозку щурів. Гіпергравітаційний стрес у статевозрілих самців щурів Wistar моделювали центрифугуванням (діаметр центрифуги 50 см) в спеціальних контейнерах протягом 1 год при 10g. Показано, що в умовах модельованої гіпергравітації спостерігалось значне зменшення Ca<sup>2+</sup>-залежного звільнення L-[<sup>14</sup>C]глутамату із синапсом великих півкуль при деполяризації пресинаптичної мембрани. Кількість звільненого із синапсом L-[<sup>14</sup>C]глутамату зменшилось з 14.4 ± 0.7 % у контрольних тварин до 6.2 ± 1.9 % у тварин після гіпергравітаційного стресу (P ≤ 0.05). При дослідженні Ca<sup>2+</sup>-незалежного звільнення L-[<sup>14</sup>C]глутамату із синапсом було виявлено лише тенденцію до його збільшення після гравітаційного навантаження. Можливо, що в результаті впливу стресу гравітаційної природи відбуваються зміни розподілу нейромедіатора між везикульованим і цитоплазматичним пулами.

---

Нарушение гравитационных условий индуцирует различного рода изменения в нервной ткани млекопитающих. Биохимическая природа нарушения процесса передачи нервного импульса продолжает оставаться невыясненной. Неизвестно 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 [1, 4—6, 8, 9, 12—14].

В настоящее время известно, что одним из основных возбуждающих нейромедиаторов в организме животных является L-глутаминовая кислота. Ткань мозга обладает значительной способностью аккумулировать глутамат. Мозг содержит большое количество глутамата, однако лишь незначительная его часть 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 нейромедиатора [7, 11, 15, 16].

Известно, что при нарушениях регуляции концентрации глутамата в синаптической щели возникает хроническое возбуждение нейрона. Глутаматэргическая сверхстимуляция может разрушать нейроны. Недавно введен в обращение термин «глутаматная нейротоксичность». Причиной глутаматной нейротоксичности является связывание глутамата с его рецепторами, результатом чего является значительное массивированное увеличение концентрации свободного цитоплазматического кальция. Нарушения, возникающие в процессе как поглощения, так и освобождения глутамата, могут быть вовлечены в патогенез нейродегенеративных болезней, таких как болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера, шизофрения, эпилепсия и др. При мозговых травмах и ишемии также наблюдаются нарушения трансмиссии глутамата [7].

Настоящее исследование посвящено анализу влияния моделированной гравитации на процесс освобождения L-глутамата синапсами больших полушарий головного мозга крыс.

Настоящее исследование посвящено анализу влияния моделированной гравитации на процесс освобождения L-глутамата синапсами 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. Синапсомы из больших полушарий головного мозга крыс выделяли сразу после окончания грави-

тационной нагрузки. В качестве контроля использовали животных, содержащихся в обычных земных условиях.

**Получение синапсом.** В опытах использовали синапсомы, выделенные из больших полушарий (одно животное на опыт) декапитированных крыс дифференциальным центрифугированием и центрифугированием в градиенте плотности фиколла-400, применяя метод Котмана [3] с небольшими модификациями: раствор сахарозы для приготовления градиента фиколла содержал 5 мМ Непес-NaOH и 0.2 мМ ЭДТА, pH 7.4. Синапсомы, полученные при фракционировании в градиенте фиколла, разводили 10 объемами 0.32 М сахарозы, 5 мМ Непес-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 Непес, pH 7.4, 10 мМ d-глюкоза. Полученную суспензию синапсомом (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>. Бескальциевая среда не содержала кальция и в нее добавляли 1 мМ ЭГТА. Все процедуры проводили при 0 °С. Концентрацию белка определяли согласно описанию [10].

**Освобождение L-глутамата.** Для определения уровня освобождения L-[<sup>14</sup>C]глутамата из синапсомом, 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 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 синапсомом разводили стандартным Ca<sup>2+</sup>-содержащим буфером из расчета 250 мкг белка синапсомом в 250 мкл суспензии на каждое измерение, преинкубировали 10 мин при 37 °С. Аликвоты суспензии синапсомом отбирали через различные промежутки времени 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.

Результаты представлены как среднее значение ± квадратичная ошибка среднего значения.

В экспериментах были использованы фиколл-400 (Serva), Непес (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 процесса освобождения глутамата, протекающего в обычных земных условиях (К-контроль) и в условиях моделированной гипергравитации (ГГ).

Необходимо отметить, что спонтанный выход L-[<sup>14</sup>C]глутамата из синапсомом характеризует состояние их плазматической мембраны. На рис. 1 представлена зависимость нестимулированного освобождения L-[<sup>14</sup>C]глутамата из К- и ГГ-синапсомом от времени инкубации. Суспензия синапсомом оставалась стабильной в течение исследуемого временного интервала как в случае контрольных, так и ГГ-синапсомом. За 6 мин наблюдалось нестимулированное освобождение 12.0 ± 2.3 % (К) и 12.5 ± 2.7 % (ГГ) накопленного L-[<sup>14</sup>C]глутамата синапсомомом больших полушарий (рис. 2). ГГ-стресс не приводил к изменению уровня базального вытекания L-[<sup>14</sup>C]глутамата из синапсомом.

Было исследовано освобождение L-[<sup>14</sup>C]глутамата из синапсомом при деполяризации плазматической мембраны 35 мМ хлористым калием в Ca<sup>2+</sup>-содержащей среде. Деполяризация плазматической

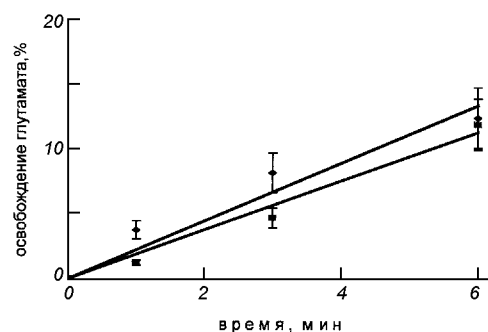


Рис. 1. Зависимость нестимулированного освобождения L-[<sup>14</sup>C]глутамата из К- и ГГ-синапсомом от времени: ромбики — контрольные синапсомомы, квадратики — ГГ-синапсомомы. График построен по результатам 12 экспериментов

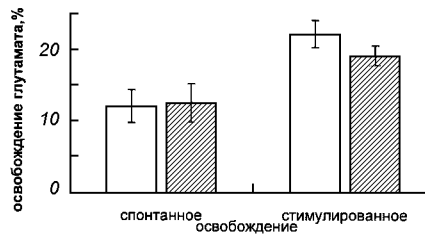


Рис. 2. Спонтанное и стимулированное 35 мМ КСl освобождение L-[<sup>14</sup>C]глутамата за 6 мин инкубации в Ca<sup>2+</sup>-содержащей среде из синапсом контрольных и подвергнутых гипергравитационному стрессу животных. График построен по результатам 8 экспериментов

мембраны в таких условиях приводит к активизации двух механизмов освобождения нейромедиатора из синапсом. Один механизм является Ca<sup>2+</sup>-зависимым — это экзоцитоз синаптических везикул, другой — Ca<sup>2+</sup>-независимый, Na<sup>+</sup>-зависимый, когда освобождение глутамата происходит посредством глутаматных транспортеров плазматической мембраны. Экспериментальные данные, представленные на рис. 2, свидетельствуют об отсутствии влияния моделированной гравитации на уровень освобождения глутамата. В контрольных синапсом депolarизация 35 мМ хлористым калием в Ca<sup>2+</sup>-содержащей среде в течение 6 мин привела к освобождению 22.1 ± 1.9 %, а в условиях моделированной гипергравитации — 19.1 ± 1.4 % L-[<sup>14</sup>C]глутамата. Разница не являлась статистически значимой.

Для определения Ca<sup>2+</sup>-независимого освобождения нейромедиатора из синапсом депolarизация хлористым калием проводилась в бескальциевой среде инкубации. Ca<sup>2+</sup>-зависимое освобождение может быть получено путем вычитания Ca<sup>2+</sup>-независимого освобождения из данных, полученных при депolarизации в Ca<sup>2+</sup>-содержащей среде. При анализе данных депolarизации синапсом в течение 30 мин в Ca<sup>2+</sup>-содержащей и бескальциевой средах инкубации можно сделать вывод об уменьшении Ca<sup>2+</sup>-зависимого освобождения нейромедиатора. За 6 мин Ca<sup>2+</sup>-зависимое освобождение (экзоцитоз) уменьшилось с 14.4 ± 0.7 % у контрольных животных до 6.2 ± 1.9 % у животных после гипергравитационного стресса ( $P \leq 0.05$ ) (рис. 3).

Таким образом, основываясь на полученных экспериментальных данных, можно сделать вывод о перераспределении нейромедиатора между цитоплазматическим и везикулированным пулами после гипергравитационной нагрузки. При этом цитоплазматический пул (Ca<sup>2+</sup>-независимое освобождение) имел тенденцию к увеличению, а везикулиро-

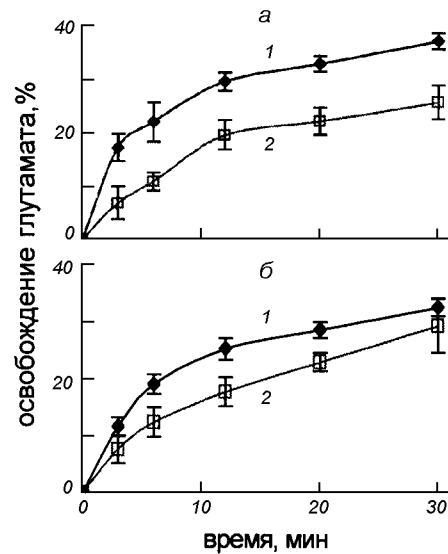


Рис. 3. Зависимость освобождения L-[<sup>14</sup>C]глутамата из синапсом контрольных животных (а) и животных после гипергравитационной нагрузки (б) от времени. Освобождение L-[<sup>14</sup>C]глутамата стимулировали добавлением 35 мМ КСl в: 1 — Ca<sup>2+</sup>-содержащей (2 мМ) и 2 — бескальциевой среде (1 мМ ЭГТА). График построен по результатам 3 экспериментов

ванный (Ca<sup>2+</sup>-зависимое освобождение), наоборот, значительно уменьшался. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что гипергравитационная нагрузка влияет на процесс освобождения глутамата, одного из основных возбуждающих нейромедиаторов в организме животных, из изолированных нервных окончаний головного мозга. Эти исследования позволяют оценить вклад этого этапа нейросекреции в синаптическую пластичность.

- 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., et al. 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., Dauntun N. G., 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.

7. Gegelashvili G., Schousboe A. Cellular distribution and kinetic properties of affinity glutamate transporters // *Brain Res. Bull.*—1998.—45, N 3.—P. 233—238.
8. Hughes-Fulford M. Altered cell function in microgravity // *Exp. Gerontol.*—1991.—26, N 2-3.—P. 247—256.
9. Krasnov I. B. Gravitational neuromorphology // *Adv. Space Biol. Med.*—1994.—4.—P. 85—110.
10. Larson E., Howlett B., Jagendorf A. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination // *Analytical Biochemistry.*—1986.—155.—P. 243—248.
11. Lipton S. A., Rosenberg P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders // *New Engl. J. Med.*—1994.—330.—P. 613—662.
12. Paschenko P. S., Sukhoterina A. F. The structural organization of the normal rat area postrema and under conditions of chronic exposure to gravitational loads // *Morfologiya.*—2000.—117.—P. 36—41.
13. 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.—P. 711—717.
14. Savina E. A., Alekseev E. I. Functional state of the posterior lobe of rats exposed aboard the biosatellite «Cosmos-936» // *Arkh. Anat. Gistol. Embriol.*—1980.—78, N 1.—P. 62—68.
15. Siesjö B. K. Basic mechanisms of traumatic brain damage // *Ann. Emergency Med.*—1993.—22.—P. 959—969.
16. 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 vitamin E to oxidative stress // *Neurochem. Res.*—1998.—23.—P. 121—125.

---

**ARTIFICIAL GRAVITY AND GLUTAMATERGIC TRANSMISSION IN CEREBRAL HEMISPHERES**

**T. Borisova, N. Krysanova, N. Himmelreich**

We investigated the effect of hypergravity stress (created by centrifugation of rats at 10g over the course of 1 hour) on the L-[<sup>14</sup>C]glutamate release from isolated rat brain cerebral hemispheres nerve terminals. It is shown that the hypergravity stress exerted a different influence on the Ca<sup>2+</sup>-dependent and the Ca<sup>2+</sup>-independent components of L-[<sup>14</sup>C]glutamate release. The Ca<sup>2+</sup>-dependent L-[<sup>14</sup>C]glutamate release stimulated with a standard stimulus, 35 mM KCl, was decreased by more than one half as a result of the hypergravity stress and was equal to 14.4±0.7 % for control animals and 6.2±1.9 % for animals exposed to hypergravity (*P* ≤ 0.05). At the same time we observed no statistically significant difference in the Ca<sup>2+</sup>-independent component of L-[<sup>14</sup>C]glutamate release. Our data allows us to make a suggestion that the redistribution of the neurotransmitter between cytosolic and vesicular pools in nerve terminals occurs in altered gravity conditions.